

MÁRCIA DO ROCIO DUARTE

Resistência a Drogas e Produção de Colicinas
em *Escherichia coli* Isolada de Urina e Fezes

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Newton Freire-Maia.

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo.

CURITIBA

1986

Agradecemos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para tornar possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| | LISTA DE TABELAS | v |
| | LISTA DE FIGURAS | ix |
| | RESUMO | x |
| | SUMMARY | xi |
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | |
| 2.1 | RESISTÊNCIA A DROGAS | 3 |
| 2.1.1 | Plasmídeos R | 6 |
| 2.1.2 | Determinantes r | 9 |
| 2.1.3 | Plasmídeos R e F | 10 |
| 2.1.4 | Conjugação bacteriana | 11 |
| 2.1.5 | Plasmídeos incompatíveis | 13 |
| 2.1.6 | Níveis de resistência | 14 |
| 2.1.7 | Mecanismos de resistência a drogas | 15 |
| 2.1.8 | Origem dos plasmídeos R | 15 |
| 2.1.9 | Resistência a drogas no Brasil | 16 |
| 2.2 | COLICINAS | 20 |
| 2.2.1 | Plasmídeos Col | 21 |
| 2.2.2 | Síntese das colicinas | 23 |
| 2.2.3 | Ação bactericida das colicinas | 25 |
| 2.2.4 | Imunidade e resistência | 30 |
| 2.2.5 | Papel seletivo das colicinas | 31 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | |
| 3.1 | AMOSTRAS BACTERIANAS | 34 |
| 3.2 | MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES | 34 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.3 | DROGAS | 36 |
| 3.4 | PREPARO DAS SOLUÇÕES DE DROGAS | 36 |
| 3.5 | ESTERILIZAÇÃO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO | 37 |
| 3.6 | ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS | 37 |
| 3.7 | SELEÇÃO, NUMERAÇÃO E ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS | 37 |
| 3.8 | DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA .. | 38 |
| 3.9 | CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS .. | 39 |
| 3.10 | TRANSFERÊNCIA DAS MARCAS DE RESISTÊNCIA .. | 39 |
| 3.11 | PRODUÇÃO DE COLICINAS | 41 |
| 3.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 42 |
| 4 | RESULTADOS | |
| 4.1 | NÍVEIS DE RESISTÊNCIA | 45 |
| 4.2 | NÍVEIS E MODELOS DE RESISTÊNCIA | 54 |
| 4.3 | NÚMERO E PORCENTAGEM DE AMOSTRAS RESISTENTES E SENSÍVEIS | 57 |
| 4.4 | ASSOCIAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS E MATERIAL DE ORIGEM | 59 |
| 4.5 | CORRELAÇÃO ENTRE DROGAS | 62 |
| 4.6 | TRANSFERÊNCIA DE MARCAS DE RESISTÊNCIA .. | 66 |
| 4.7 | PRODUÇÃO DE COLICINAS | 68 |
| 4.8 | CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS E CAPACIDADE COLICINOGENICA | 69 |
| 5 | DISCUSSÃO E CONCLUSÕES | |
| 5.1 | RESISTÊNCIA A DROGAS | 70 |
| 5.2 | PRODUÇÃO DE COLICINAS | 77 |
| 5.3 | CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS E COLICINOGENIA | 78 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Preparo das soluções de drogas | 36 |
| 2 | Níveis de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas | 46 |
| 3 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, dispostas segundo os níveis de resistência apresentados frente a oito drogas | 49 |
| 4 | Níveis e modelos de resistência de 93 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas | 55 |
| 5 | Número e porcentagem de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, classificadas como sensíveis, mono e polirresistentes | 57 |
| 6 | Número e porcentagem de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, classificadas como resistentes e sensíveis, dispostas segundo a droga ensaiada | 57 |
| 7 | Número e porcentagem de amostras de <i>Escherichia coli</i> classificadas como resistentes frente a oito drogas e dispostas segundo o material de origem | 58 |
| 8 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> resistentes e sensíveis frente a oito drogas, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 | 59 |

| | | |
|----|--|----|
| 18 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e ao cloranfenicol, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset | 63 |
| 19 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à canamicina, valor do teste χ^2 e coeficiente \emptyset | 63 |
| 20 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à estreptomicina e valor do teste de χ^2 | 64 |
| 21 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à tetraciclina e valor do teste de χ^2 | 64 |
| 22 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à canamicina, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset | 64 |
| 23 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à estreptomicina e valor do teste de χ^2 | 65 |
| 24 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à tetraciclina, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset | 65 |
| 25 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à canamicina e à estreptomicina e valor do teste de χ^2 | 65 |

| | | |
|----|---|----|
| 26 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à canamicina e à tetraciclina, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset | 66 |
| 27 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à estreptomicina e à tetraciclina e valor do teste de χ^2 | 66 |
| 28 | Modelos de resistência de 16 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes e marcas transferidas para <i>Escherichia coli</i> K12 | 67 |
| 29 | Número e porcentagem de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, colicinogênicas e não colicinogênicas frente a <i>Escherichia coli</i> K12 | 68 |
| 30 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> colicinogênicas e não colicinogênicas, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 | 68 |
| 31 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> resistentes e sensíveis, classificadas segundo a capacidade colicinogênica, e valor do teste de χ^2 | 69 |
| 32 | Número de amostras de <i>Escherichia coli</i> mono e polirresistentes, classificadas como colicinogênicas e não colicinogênicas, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente ao ácido nalidíxico | 50 |
| 2 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à ampicilina | 50 |
| 3 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente ao cloranfenicol ... | 51 |
| 4 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à amicacina | 51 |
| 5 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à canamicina | 52 |
| 6 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à estreptomicina ... | 52 |
| 7 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à gentamicina | 53 |
| 8 | Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente à tetraciclina | 53 |
| 9 | Representação gráfica da porcentagem de amostras resistentes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas | 58 |

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se determinarem em *Escherichia coli* isolada de urina e fezes os níveis de resistência das amostras frente à ampicilina, amicacina, canamicina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, ao ácido nalidíxico e cloranfenicol; a natureza da resistência através da pesquisa de plasmídeos R; e a capacidade de produção de colicinas.

Dentre 120 amostras, 22,50% foram sensíveis, 20,00% monorresistentes e 57,50% polirresistentes às drogas ensaiadas. Não foi constatada diferença significativa entre amostras mono e polirresistentes quanto ao material de origem. No entanto a proporção de amostras resistentes isoladas de urina foi maior do que a proporção das isoladas de fezes, em relação à ampicilina, estreptomicina e ao cloranfenicol.

Foi observada correlação positiva entre ampicilina, cloranfenicol, canamicina e tetraciclina, e transferência parcial e total dessas marcas através de conjugação.

Foram produtoras de colicina 18,33% das amostras, não tendo sido encontrada diferença significativa na frequência de colicinogenia quanto à origem do material. Entretanto foi observada uma maior tendência à capacidade colicinogênica nas amostras monorresistentes, particularmente estreptomicina-resistentes.

SUMMARY

The present research was carried out to test *Escherichia coli* from urine and faeces for resistance level to ampicillin, amikacin, kanamycin, streptomycin, gentamicin, tetracycline, nalidixic acid and chloramphenicol. The presence of R plasmids and colicin production was also investigated.

Of 120 samples tested, 22.50% were sensitive, 20.00% were resistant to one drug and 57.50% to several drugs. There was no statistical difference between the frequencies of single and multiple resistance regarding the origin of the material. Nevertheless, the proportion of resistant samples was higher among those taken from urine than the ones from faeces in relation to ampicillin, streptomycin and chloramphenicol.

A positive correlation was noted among ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and tetracycline as well as partial or total transfer of these resistance markers by conjugation.

18.33% of the samples were colicin producers. No statistical difference was found concerning colicinogenic frequency between the samples from urine and those from faeces. However, a certain association between colicinogeny and single resistant samples was noted, particularly those resistant to streptomycin.

1 INTRODUÇÃO

A resistência a drogas está condicionada à presença de determinantes genéticos de localização cromossômica ou extracromossômica. A primeira modalidade de resistência é conferida por mutação de genes cromossômicos e geralmente envolve apenas uma droga. A resistência conferida por genes extracromossômicos é denominada de resistência infecciosa e freqüentemente é múltipla, envolvendo simultaneamente duas ou mais drogas não relacionadas e de importância terapêutica.

A resistência infecciosa é condicionada por elementos genéticos denominados inicialmente de fatores de resistência ou R, e hoje conhecidos como plasmídeos R, os quais conferem diferentes níveis de resistência para várias drogas e apresentam expressividade variável segundo as células hospedeiras.

Os plasmídeos R são passíveis de transferência a células bacterianas através do processo de conjugação, transdução ou transformação, à semelhança de outros plasmídeos, como os que conferem às bactérias capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, designadas de bacteriocinas.

As primeiras bacteriocinas a serem estudadas foram as colicinas, as quais são produzidas por *Escherichia coli* e enterobactérias relacionadas, e atuam sobre o crescimento de

linhagens da mesma espécie ou mesmo, em alguns casos, em espécies e gêneros diferentes. As colicinas são distinguíveis dos antibióticos por requererem a presença de receptores específicos na superfície bacteriana para exercer sua ação bactericida.

A síntese de colicina está condicionada à presença de determinantes genéticos de localização extracromossômica, denominados de plasmídeos colicinogênicos ou Col. A produção de colicinas ocorre através de biossíntese letal e, sob condições normais, poucos representantes de uma linhagem colicinogênica as sintetizam. Estudos têm sido conduzidos para verificação da possível vantagem seletiva conferida pelas colicinas às linhagens potencialmente produtoras, em ambientes distintos.

Em amostras de *E. coli* isoladas de urina, como agente etiológico de processo infeccioso, e de fezes, como integrante da flora intestinal normal, o presente trabalho objetivou: (1) determinar os níveis de resistência das amostras frente a oito drogas; (2) verificar a natureza dessa resistência através da pesquisa da existência de plasmídeos R; (3) investigar a produção de colicinas; e (4) comparar os resultados observados segundo a origem das amostras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA A DROGAS

Na pesquisa de compostos que permitissem o controle de doenças infecciosas, surgiu a quimioterapia na Alemanha no começo do século, com a finalidade de estudar de modo experimental fármacos capazes de influenciar etiologicamente as moléstias infecciosas. Assim, em 1905 Ehrlich (citado por MITSUHASHI, 1965; MINGOIA, 1967) iniciou suas pesquisas, visando a obtenção de compostos químicos que tivessem uma toxicidade seletiva em células parasitárias e fossem inócuos ao hospedeiro. A contribuição da quimioterapia na terapêutica antibacteriana foi intensificada por Domagk em 1935 (citado por MINGOIA, 1967) com a descoberta da *p*-sulfamidocrisoidina (Prontosil rubrum®), um corante azóico cuja atividade bacteriostática se atribuiu ao grupo sulfanilamídico. Numerosas sulfas foram descobertas e, até o início da Segunda Guerra Mundial, constituíam-se nos únicos agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento das infecções bacterianas.

A antibioticoterapia surgiu na Inglaterra em 1929, com a descoberta da penicilina por Fleming (citado por MITSUHASHI, 1965; LACAZ, 1969), e foi impulsionada pelos estudos desenvolvidos nos anos subseqüentes, sobre os produtos metabóli-

cos dos fungos, especialmente os do gênero *Penicillium*. A descoberta da penicilina induziu muitos pesquisadores ao isolamento de novos antibióticos, cuja utilização contribuiu para transformar radicalmente o panorama das doenças infecciosas.

Paralelamente ao desenvolvimento dos quimioterápicos e antibióticos, foi observado o fenômeno de resistência a drogas, representando um problema sério no campo clínico e epidemiológico, à medida que populações microbianas sensíveis eram substituídas por resistentes às drogas em uso (MITSUHASHI, 1965; MINGOIA, 1967; LACAZ, 1969; KOCH, 1981). LURIA & DELBRUCK (1943), DEMEREC (1948), NEWCOMBE (1949) e LEDERBERG & LEDERBERG (1952) demonstraram que a emergência de variantes resistentes em condições normais de crescimento ocorria por mutação espontânea, cabendo às drogas um papel meramente seletivo.

Suzuki e cols. em 1952 (citados por MITSUHASHI, 1969) foram os primeiros a demonstrar em uma linhagem de *Shigella* resistência envolvendo estreptomicina, tetraciclina e sulfanilamida, a qual foi denominada de resistência múltipla, por referir-se simultaneamente a muitas drogas não relacionadas e de importância terapêutica. Em 1955 Kitamoto e cols. (citados por MITSUHASHI, 1965) isolaram a linhagem *Shigella flexneri* 4a resistente à sulfanilamida, estreptomicina, tetraciclina e ao cloranfenicol. MITSUHASHI (1969) mencionou um terceiro isolamento de uma linhagem de *Shigella* com resistência múltipla no Japão em 1956. Subseqüentemente em 1957, linhagens de *Escherichia coli* tetrarresistentes foram isoladas durante uma epidemia causada por *S. flexneri* 3a resistente às

mesmas drogas. Em 1958, em um único paciente, foram isoladas linhagens de *E. coli*, *Escherichia freundii* e *S. flexneri* 2a com o mesmo padrão de resistência (MITSUHASHI e cols., 1961).

Ochiai e cols. em 1959 e Akiba e cols. em 1960 (citados por WATANABE & FUKASAWA, 1960, 1961a; MITSUHASHI, 1969) demonstraram que a resistência múltipla a drogas, em amostras de *E. coli*, podia ser transferida em bloco para *Shigella* sensível em cultura mista, através de conjugação, já que filtrados livres de células de linhagens resistentes não podiam conferir resistência a linhagens sensíveis. Posteriormente, observou-se que os plasmídeos F ("fertility") não participavam do processo de transferência da resistência múltipla, uma vez que uma célula F⁻ (sem plasmídeo F) era capaz de transferir resistência múltipla a outra célula F⁻ (MITSUHASHI, 1965); e que a resistência podia também ser transferida por transdução (WATANABE & FUKASAWA, 1961a; MITSUHASHI e cols., 1962; SUGINO & HIROTA, 1962; WATANABE e cols., 1964b) e transformação (COHEN e cols., 1972; CLEWELL, 1981).

Desse modo, foi caracterizado um novo tipo de resistência, que diferia da conhecida resistência por mutação de genes cromossômicos, geralmente envolvendo apenas uma droga, conforme mencionado na revisão de FERNANDES & TRABULSI (1968).

A resistência múltipla foi denominada de resistência infecciosa, devido à facilidade com que se transferia (MORENO, 1972), sendo largamente distribuída entre bacilos Gram-negativos: todos os gêneros de Enterobacteriaceae (HARADA e cols., 1960), *Pasteurella pestis* e *Pasteurella pseudotuberculosis* (GINOZA & MATNEY, 1963), *Pseudomonas aeruginosa* (HELINSKI,

1973), *Vibrio cholerae* (BARON & FALKOW, 1961), *Haemophilus ducreyi* (DENEER e cols., 1982), *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae* (STUY, 1980) e *Bacteroides fragilis* (RASHTCHIAN & BOOTH, 1981; WELCH & MACRINA, 1981); e relatada em organismos Gram-positivos: *Streptococcus faecalis* (JACOB & HOBBS, 1974), *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus lactis* (NEVE e cols., 1984), *Staphylococcus aureus* (NOVICK, 1969; HELINSKI, 1973; ELWELL & SHIPLEY, 1980), *Staphylococcus epidermidis* (FORBES & SCHABERG, 1983), *Bacillus subtilis* (ECCLES e cols., 1981), *Clostridium* sp. e *Streptomyces* sp. (HARDY, 1981).

2.1.1 PLASMÍDEOS R

A resistência infecciosa é condicionada por determinantes genéticos extracromossômicos, designados inicialmente de fatores de resistência ou R (MITSUHASHI, 1965), e atualmente de plasmídeos R (HARDY, 1981; McCOMBIE e cols., 1983).

Os plasmídeos R são constituídos de ácido desoxirribonucléico (DNA) (FALKOW e cols., 1966), sob a configuração de duplex circular fechado (MITSUHASHI, 1965; NISIOKA e cols., 1969; COHEN & MILLER, 1970; SILVER & FALKOW, 1970; VAPNEK e cols., 1971; HELINSKI, 1973; MILLIKEN & CLOWES, 1973; IMANAKA e cols., 1981), replicado semiconservativamente (BAZARAL & HELINSKI, 1970; HARDY, 1981). O tamanho desses plasmídeos varia de 1×10^6 a 2×10^8 daltons (HARDY, 1981), sendo geralmente os menores não conjugativos e mais frequentes em bactérias Gram-positivas (DAVIES & SMITH, 1978).

Os plasmídeos R existem como replicons únicos ou agregados de componentes isolados (McCOMBIE e cols., 1983), os quais compreendem o bloco de genes de resistência (determinantes r) (PETERSON & ROWND, 1983) e a região de transferência RFT ("resistance transfer factor") (WATANABE, 1963; DATTA, 1965; MEYNELL & DATTA, 1965; COHEN e cols., 1971; HARDY, 1981).

Adicionalmente, segundo a revisão de MITSUHASHI (1969), os plasmídeos R estão também envolvidos com marcadores genéticos, que governam a estabilidade e a replicação autônoma dos mesmos, bem como a transferência de genes cromossômicos. Além destes, podem estar eventualmente envolvidos com outros determinantes que condicionam resistência a colicinas (SICCARDI, 1966; HARDY, 1981) e íons metálicos (OHNISHI & AKIMOTO, 1980), síntese de penicilinase (ANDERSON & DATTA, 1965; DATTA & KONTOMICHALOU, 1965; SMITH & ARMOUR, 1966), produção de ácido sulfídrico e capacidade fermentativa da rafinose (ØRSKOV & ØRSKOV, 1973) e lactose (CAMPBELL, 1981).

Embora assumam preferencialmente a forma autônoma no citoplasma da célula, os plasmídeos R podem integrar-se ao cromossomo bacteriano, mobilizando-o e promovendo a transferência de suas informações (WATANABE & FUKASAWA, 1961a; WATANABE, 1963; MITSUHASHI, 1969; STUY, 1980). Foi essa observação que levou Pearce & Meynell em 1968 (citados por FERNANDES & TRABULSI, 1968) a proporem a inclusão desses plasmídeos na categoria dos episômos. Estes, de acordo com o modelo proposto por Campbell em 1962 (citado por CURTISS III, 1969), assumem uma estrutura circular, quando no estado au-

tônomo, e são levados à integração com o cromossomo bacteriano através de permuta recíproca.

O número de cópias do plasmídeo R por célula é variável. ROWND e cols. (1966, 1971) apresentaram evidências da presença de um único plasmídeo em linhagens de *E. coli* e *Serratia marcescens*, e de cerca de 10 cópias em *Proteus mirabilis*, sugerindo a existência de mecanismos distintos de regulação, em sincronia com a duplicação cromossômica ou independente desta. Em condições especiais de cultivo, onde são adicionadas elevadas concentrações de antibiótico, frente ao qual as bactérias são resistentes, PETERSON & ROWND (1983) observaram freqüentemente um aumento no número de cópias dos genes de resistência. Essa ocorrência foi atribuída à multiplicação das cópias do plasmídeo R ou à amplificação seletiva de regiões específicas relacionadas com genes de resistência. Essa amplificação resulta geralmente em duplicação *in tandem* e eleva os níveis de resistência a drogas (WIEBAUER e cols., 1981).

Dois modelos têm sido propostos para explicar a manutenção de um número fixo de cópias de plasmídeos nas células em condições normais. No primeiro modelo, os plasmídeos competiriam por um iniciador que, a uma concentração adequada, atuaria positivamente na replicação. Por outro lado, no segundo modelo, a replicação plasmidial seria controlada negativamente por um repressor, cuja concentração na célula determinaria a freqüência de iniciação da replicação (GUSTAFSSON & NORDSTRÖM, 1980; MIKI e cols., 1980; HARDY, 1981; EASTON & ROWND, 1982). MOLIN & NORDSTRÖM (1980) sugeriram que o mes-

mo gene que governa a replicação plasmidial é responsável pelo controle do número de cópias e incompatibilidade entre plasmídeos.

2.1.2 DETERMINANTES r

A resistência conferida pelos determinantes r pode envolver sulfonamidas, tetraciclinas, penicilinas, nitrofurantoína, trimetoprim, estreptomicina, cloranfenicol, íons metálicos, gentamicina, neomicina e canamicina (KABINS & COHEN, 1966; CAMPOS e cols., 1976; DAVIES & SMITH, 1978; HARDY, 1981; CHOPRA e cols., 1982; FOSTER, 1983). A resistência a polimixinas (polimixina B e colimicina) e ácido nalidíxico parece não envolver genes extracromossômicos (FERNANDES & TRABULSI, 1968; HARDY, 1981).

O número de determinantes r por plasmídeo é variável: 1, 2, 3, 4 ou mais (FERNANDES & TRABULSI, 1968). Em nosso meio, observaram-se com frequência plasmídeos R com cinco marcadores de resistência (ZULIANI & TRABULSI, 1968). Anderson & Datta em 1965 (citados por DATTA, 1965) relataram a ocorrência de um plasmídeo R com marcadores para sete drogas.

Os determinantes r, segundo KLECKNER (1981), podem ser freqüentemente incorporadas em unidades genéticas discretas denominadas de transposons, as quais se caracterizam pela capacidade de se transporem de uma molécula de DNA para outra. Esses transposons, conferindo resistência a drogas, contribuem para a rápida disseminação da resistência infecciosa e têm sido descritos por vários autores: HARDY (1981),

THOMSON e cols. (1981), WIEBAUER e cols. (1981), FOUTS & BARBOUR (1982), MEYER e cols. (1983), TANAKA e cols. (1983), DE VOS e cols. (1984), O'NEIL e cols. (1984) e KLOCK e cols. (1985).

2.1.3 PLASMÍDEOS R e F

Linhagens bacterianas que albergam o plasmídeo R são geralmente designadas por R^+ , em oposição àquelas que não o possuem, designadas por R^- (SUGINO & HIROTA, 1962). À parte a resistência a drogas e a sua transferência, uma linhagem recombinante resistente ou transconjugante é semelhante à parental sensível (WATANABE & FUKASAWA, 1960). No entanto existem algumas características das linhagens R^+ , apontadas por DATTA (1965), que as distinguem das R^- , tais como: transferência de genes cromossômicos, elevação da taxa de mutação e repressão do plasmídeo F pelo plasmídeo R.

Muitos plasmídeos R, quando presentes em células albergando o plasmídeo F, suprimem a função deste. Essa classe de plasmídeos R é denominada fi^+ ("fertility inhibition") e aqueles plasmídeos R que não reprimem a manifestação de F são denominados fi^- (WATANABE e cols., 1964a; CLOWES, 1972; HARDY, 1981).

Para Watanabe e cols. em 1961 e Watanabe & Fukasawa em 1962 (citados por WATANABE, 1963), o determinante genético de RTF possui um caráter epistático em relação ao determinante genético do plasmídeo F. MEYNELL & DATTA (1965) postularam que o plasmídeo Rfi^+ está sob o controle de um repressor condicionado por um gene regulador, que não se manifesta

imediatamente após o processo de conjugação e que, uma vez estabelecido, pode reprimir F. Essa hipótese explicaria por que células que recentemente adquiriram o plasmídeo R são mais infectantes, comparativamente àquelas que o albergam há muitas gerações e mantêm um estado de repressão efetiva. HIROTA e cols. (1964) observaram que a repressão atinge diferentes funções do plasmídeo F, possivelmente pela existência de um mecanismo de inibição pleiotrópica. Por outro lado, os plasmídeos Rfi⁻ não suprimem as funções de F, por não determinarem a produção de um repressor ou por produzirem um repressor inativo em F (MEYNELL e cols., 1968).

2.1.4 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

CLARK & WARREN (1979) e WILLETTS & SKURRAY (1980) propuseram um modelo para representar os vários estágios do processo de conjugação, que basicamente envolve quatro etapas: (a) formação de agregados específicos de células conjugantes; (b) promoção de contatos específicos, através da interação do pílus ou fímbria sexual do doador com um receptor localizado na superfície da célula receptora; (c) mobilização e transferência do plasmídeo; e (d) expressão fenotípica dos genes transferidos à célula receptora.

OU & ANDERSON (1970) concluíram que a fímbria sexual desempenha pelo menos três importantes papéis na conjugação: (a) serve de elemento de conexão entre as células doadora e receptora; (b) facilita a transferência do material genético;

e (c) leva as células a um íntimo contato, aumentando a fertilidade da união.

As condições que governam a frequência de transferência dos plasmídeos R são o resultado da interação de muitos fatores: compatibilidade e estado fisiológico das linhagens doadora e receptora; taxa de transferência de RTF; tipos de plasmídeo R (fi^+ ou fi^-); natureza da ligação entre os determinantes r e RTF; tipo de fímbria sexual; e densidade das culturas relativamente à frequência de colisões entre as células (ANDERSON, 1968).

WATANABE (1963), TOLEDO e cols. (1970) e HUGHES e cols. (1981) relacionaram alguns fatores que dificultam ou impossibilitam a transferência dos plasmídeos R através do processo de conjugação: produção de colicinas ou fagos por uma das células participantes da conjugação; ausência de RTF; presença de RTF defectivos ou integrados estavelmente ao cromossomo bacteriano; e presença exclusiva de marcadores de resistência cromossômica na célula doadora.

Embora a resistência infecciosa seja suficientemente estável para manter linhagens bacterianas resistentes por longos períodos de tempo, mesmo em condições artificiais (ANDERSON, 1968), os plasmídeos R podem ser perdidos espontaneamente, de modo total ou parcial, a uma frequência de 1/100 da população celular, de acordo com o trabalho experimental de DATTA (1965) e análise numérica realizada por GERDES e cols. (1985).

Diferentes fatores podem estar relacionados com a perda de plasmídeos, segundo SCHUKIN (1981): (a) inibição da

replicação do plasmídeo como resultado de mutação cromossômica ou plasmidial; (b) mutação plasmidial afetando a divisão celular; (c) incompatibilidade entre plasmídeos; e (d) presença de agentes de "cura" no meio de cultura. Tratamento com corantes do grupo das acridinas aumenta a frequência de eliminação dos plasmídeos R (WATANABE & FUKASAWA, 1961a; BARROS e cols., 1968), número que pode ser elevado pela exposição prévia das células à irradiação com luz ultravioleta (WATANABE & FUKASAWA, 1961b).

Linhagens bacterianas resistentes por mutação de genes cromossômicos podem ser infectadas por plasmídeos R, passando a apresentar as duas modalidades de resistência. Do mesmo modo que a presença de um plasmídeo R em uma célula não impede a entrada de outros, conforme mencionado na revisão de FERNANDES & TRABULSI (1968). Contudo, essa resistência pode ser instável, levando à perda total ou parcial dos plasmídeos R, quando incompatíveis (WATANABE e cols., 1964a; ROMERO & MEYNELL, 1969).

2.1.5 PLASMÍDEOS INCOMPATÍVEIS

Os plasmídeos R e demais plasmídeos transmissíveis a *E. coli*, com referência a sua coexistência estável em uma célula na ausência de pressão seletiva, foram classificados em grupos de incompatibilidade e relacionados com vários tipos de fímbrias sexuais (BRODA, 1979; BRADLEY, 1980).

Muitos dos plasmídeos R conjugativos encontrados em enterobactérias, segundo o tipo de fímbria sexual produzida

e a sua capacidade de reprimir a expressão do plasmídeo F, são classificados como do tipo F (fi^+) e tipo I (fi^-), de acordo com LAWN e cols. (1967), VAPNEK e cols. (1971) e HARDY (1981).

A impossibilidade da coexistência estável de tipos homólogos de plasmídeos R em uma célula, portanto pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade, caracteriza imunidade à superinfecção (MEYNELL e cols., 1968). Essa observação levou à sugestão da existência de sítios específicos de integração celular para cada tipo de plasmídeo R, provavelmente a nível de membrana citoplasmática. Conseqüentemente, tipos homólogos de plasmídeos R competiriam pelo mesmo sítio de integração, criando uma instabilidade que resultaria em segregação ou recombinação genética dos mesmos (WATANABE e cols., 1964a; ANDERSON, 1968; CLOWES, 1972; DAVIES & SMITH, 1978; BRODA, 1979; HARDY, 1981).

2.1.6 NÍVEIS DE RESISTÊNCIA

Os níveis de resistência conferidos pelos plasmídeos R variam de droga para droga e a sua frequência de transferência por conjugação, bem como a expressão do nível de resistência podem diferir de uma célula receptora para outra (WATANABE & FUKASAWA, 1961a; WATANABE, 1963; TOLEDO e cols., 1970).

Os efeitos da presença de dois genes conferindo diferentes níveis de resistência à mesma droga em uma célula foram estudados por vários autores. Trabalhos experimentais de

Chabbert & Le Minor em 1966 (citados por FERNANDES & TRABULSI, 1968) demonstraram que a célula expressa somente o nível de resistência mais elevado, não sendo observadas interações gênicas. Em divergência, Reeve em 1966 (citado por ANDERSON, 1968), Pearce & Meynell em 1968 (citados por FERNANDES & TRABULSI, 1968) e SETLOW e cols. (1982) relataram a observação de efeitos sinérgicos entre genes.

2.1.7 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS

Os possíveis mecanismos bioquímicos de resistência a drogas foram relacionados por DAVIES & SMITH (1978) e FOSTER (1983), como envolvendo: (a) alteração no sítio celular de fixação da droga; (b) bloqueio no transporte da droga para o interior da célula; (c) detoxificação ou inativação da droga; e (d) presença de passo metabólico alternativo em substituição àquele inibido pela droga.

2.1.8 ORIGEM DOS PLASMÍDEOS R

A origem dos plasmídeos R é usualmente sugerida como sendo o resultado da captação de genes cromossômicos de resistência pelo RTF, em sucessivas bactérias hospedeiras, passando o conjunto a ter comportamento genético independente (WATANABE, 1963; DATTA, 1965). A constatação de plasmídeos R com número variável de determinantes r é consistente com esse modelo (SMITH & ARMOUR, 1966).

Contrariamente, para ANDERSON (1968), GUERRY e cols. (1974) e CAMPBELL (1981), os determinantes de resistência parecem ter-se originado por mutação de elementos extracromossômicos não conjugativos, que se associaram a determinantes sexuais, capazes de mobilizá-los. Esse modelo é sustentado pela evidência de que os determinantes *r* não exibem geneticamente homologia com o cromossomo bacteriano (MEYNELL e cols., 1968; NOVICK, 1969).

FOSTER (1983) sugeriu que os genes de resistência, originariamente presentes como um mecanismo de autoproteção em microrganismos do solo produtores de antibióticos, tenham sido transferidos para bactérias de importância clínica, diretamente ou através de uma série de hospedeiros intermediários, vetores plasmidiais e transposons.

2.1.9 RESISTÊNCIA A DROGAS NO BRASIL

A resistência infecciosa tem sido estudada por grupos de investigadores de diferentes países. No Brasil, FERNANDES & TRABULSI (1968) apresentaram uma revisão sobre o assunto.

BARROS e cols. (1968) analisaram 110 amostras de *E. coli*, visando à constatação da presença e frequência de plasmídeos R, através de tratamento com acridinas. Concluíram que pelo menos 50% das linhagens resistentes ensaiadas apresentavam plasmídeos R.

ZULIANI & TRABULSI (1968) determinaram a sensibilidade de 166 amostras de *Shigella* isoladas em São Paulo, entre 1962 e 1966, frente à sulfadiazina, estreptomicina, tetraci-

clina, neomicina, hetacilina e ao cloranfenicol; evidenciando uma elevada frequência de amostras com resistência múltipla.

PINHEIROS e cols. (1969), analisando 306 linhagens de *E. coli* com relação à susceptibilidade ou resistência a sete drogas, observaram 19 diferentes modelos de resistência e demonstraram a alta incidência de plasmídeos R nas amostras ensaiadas.

TRABULSI e cols. (1970) determinaram quantitativamente os níveis de resistência de 330 amostras de *Shigella* isoladas em São Paulo, entre 1963 e 1968, frente a nove drogas, caracterizando duas populações distintas: uma sensível e outra resistente a cinco drogas. Concluíram que o número de amostras monorresistentes à sulfadiazina diminuiu a partir de 1963, dando lugar progressivamente a amostras pentarresistentes.

TOLEDO e cols. (1970) verificaram a presença de plasmídeos R em 209 amostras de *Shigella* resistentes a uma ou mais das seguintes drogas: sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e canamicina. Demonstraram que quase 50% das amostras apresentavam resistência transferível parcial ou total.

MORENO (1972) determinou a resistência de 375 amostras de *E. coli* isoladas de animais, frente à tetraciclina, canamicina, cefalotina, hetacilina e estreptomicina. Os resultados demonstraram que a grande maioria das amostras era resistente simultaneamente a duas ou três drogas e que aquelas com

marcadores para a hetacilina, cefalotina e canamicina não os transferiam.

SOUZA (1975) analisou 100 amostras de *E. coli* isoladas de urina e fezes, com o objetivo de determinar os níveis de resistência frente à estreptomicina, canamicina, cefalotina, tetraciclina, hetacilina, gentamicina e ao bicloreto de mercúrio, cloranfenicol e ácido nalidíxico; e a natureza da resistência através da pesquisa de plasmídeos R. Observou que 37% das amostras eram resistentes, sendo a maioria delas a duas ou mais drogas, e que a frequência de resistência transferível era relativamente alta (62%).

MAGALHÃES & VÉRAS (1979) caracterizaram três diferentes classes de plasmídeos R de linhagens multirresistentes de *Salmonella typhimurium*, quanto à autotransferência, determinantes r e grupo de incompatibilidade.

SOARES & TRABULSI (1979) determinaram a concentração inibitória mínima de sisomicina, gentamicina e tobramicina para 534 amostras de bactérias, compreendendo enterobactérias, cocos Gram-positivos e *Pseudomonas*. Verificaram que a atividade antibacteriana dos três aminoglicosídeos foi semelhante, embora a sisomicina se tenha apresentado mais ativa para a maioria das amostras estudadas.

ALMADA & TRABULSI (1980) observaram que a presença de plasmídeos R em *Shigella* e *E. coli* não afetavam a virulência ou o crescimento das amostras estudadas, enquanto que mutações cromossômicas condicionando resistência a drogas, exceção feita ao ácido nalidíxico, resultavam em diminuição da taxa de crescimento e virulência das bactérias.

BIAGI (1982) determinou os níveis de resistência de 81 bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, frente a 14 drogas. Com base nos resultados obtidos sugeriu que as drogas efetivas contra *Xanthomonas* seriam bicloreto de mercúrio, canamicina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina; contra *Pseudomonas*, canamicina; e para o gênero *Erwinia*, canamicina e gentamicina.

SILVA e cols. (1983) estudaram 90 amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) isoladas em São Paulo, nos anos de 1981 e 1982, constatando que 98% delas se apresentavam resistentes a pelo menos uma das drogas testadas.

TEIXEIRA e cols. (1984) realizaram testes de sensibilidade a 18 antimicrobianos em 175 amostras de *Shigella*, isoladas no Rio de Janeiro entre 1960 e 1978. Todas as amostras apresentaram-se sensíveis à gentamicina, tobramicina, polimixina e nitrofurantoína, sendo demonstrada uma elevada frequência de amostras resistentes à eritromicina, sulfadiazina e estreptomicina.

BERCHIERI Jr. e cols. (1985) testaram a sensibilidade de 139 amostras de *Salmonella*, isoladas de farinha de origem animal e destinadas à fabricação de rações. Observaram que todas as cepas foram sensíveis ao cloranfenicol e sulfato de colistina e resistentes à bacitracina, penicilina e ao sulfazotrim.

SANT'ANA & SOUZA (1985), analisando 230 amostras de *Salmonella typhimurium* quanto à propriedade colicinogênica e níveis de resistência frente a 10 antimicrobianos, encontraram cinco amostras colicinogênicas e 13 resistentes a drogas,

sendo a marca para a tetraciclina a mais freqüentemente observada.

2.2 COLICINAS

A inibição de bactérias por espécies intimamente relacionadas foi relatada em trabalhos que datam do século XIX, sendo, no entanto, observado progresso na compreensão do fenômeno somente no início do século XX, através dos estudos desenvolvidos por Gratia e Fredericq (citados por HARDY, 1975).

Na Bélgica, em 1925, Gratia (citado por FREDERICQ, 1953; DAVIS e cols., 1969; BRODA, 1979; FRICK e cols., 1981) descobriu que filtrados da linhagem *E. coli* V inibiam o crescimento de *E. coli* Ø. O mesmo fenômeno foi constatado em outras linhagens de *E. coli* por Fredericq em 1946 (citado por REEVES, 1965). Essa substância inibitória recebeu a denominação de colicina, termo originalmente empregado para caracterizar a síntese por *E. coli*. No entanto, como o mesmo fenômeno foi observado em *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia freundii* (FREDERICQ, 1957), através da produção de substâncias relacionadas àquelas produzidas por *E. coli*, as mesmas foram incluídas no grupo das colicinas.

As colicinas foram as primeiras bacteriocinas estudadas em detalhe, sendo estas últimas definidas por JACOB e cols. (1953) como "proteínas do tipo colicina caracterizadas por biossíntese letal, atividade intra-específica e adsorção

a receptores específicos". Por ser muito abrangente essa definição, estudos feitos sobre bacteriocinas revelaram uma evidente heterogeneidade de estruturas químicas no comportamento de determinantes genéticos e na extensão e especificidade do espectro de ação, sendo a definição gradualmente modificada. KONISKY (1982), adotando um critério meramente funcional, definiu as bacteriocinas como sendo proteínas ou complexos protéicos inativos frente à bactéria produtora. Com a finalidade de se manter uma distinção entre bacteriocinas e antibióticos, NOMURA (1967) definiu as primeiras como sendo substâncias antibacterianas que requerem a presença de um receptor específico para sua ação.

2.2.1 PLASMÍDEOS COL

A síntese de colicinas está condicionada à presença de determinantes genéticos extracromossômicos denominados de fatores colicinogênicos (fatores Col) ou plasmídeos Col (HELINSKI, 1973; KONISKY, 1982), classificados como elementos epissômicos por Jacob e cols. em 1960 (citados por IVÂNOVICS, 1962). Para DAVIS e cols. (1969), os plasmídeos colicinogênicos podem assumir três formas distintas na célula: (a) integrada, à semelhança do profago ou Hfr ("high frequency"); (b) autônoma, não letal, à semelhança de F; e (c) induzida, letalmente produzindo colicinas, à semelhança do fago vegetativo.

Os plasmídeos Col são constituídos de DNA circular (ROTH & HELINSKI, 1967; BIRGE, 1981) e transferidos às célu-

las bacterianas através de conjugação, transdução (FREDERICQ, 1963; DAVIS e cols., 1969) ou transformação (MALES & STOCKER, 1982).

HARDY (1975) classificou os plasmídeos Col, segundo o seu peso molecular, em dois grupos distintos. O primeiro compreende plasmídeos pequenos, com peso molecular ao redor de 5×10^6 , suficiente DNA para 10 proteínas, cada uma com peso molecular de 30 000. O segundo grupo compreende plasmídeos maiores, com peso molecular entre 62×10^6 e 94×10^6 , suficiente DNA para codificar 100 proteínas diferentes, cada uma com peso molecular de 30 000. Os plasmídeos pequenos necessitam ser mediados por outros plasmídeos na conjugação, não sendo por si sós conjugativos, enquanto que os maiores são autotransferíveis.

Comparativamente aos plasmídeos R, MEYNELL e cols. (1968) classificaram os plasmídeos colicinogênicos conjugativos, segundo a capacidade de repressão do plasmídeo F e tipo de fímbria sexual produzida, em fi^+ (fímbria sexual do tipo F) e fi^- (fímbria sexual do tipo I).

Os plasmídeos Col compreendem, além dos cistrons estruturais que codificam as colicinas, genes para o controle da síntese e liberação das mesmas, e gene que confere imunidade às colicinas homólogas (NOVICK, 1969; WEAVER e cols., 1981; PUGSLEY & SCHWARTZ, 1983; PUGSLEY, 1984). Além destes, podem estar relacionados com genes que condicionam resistência a drogas e virulência (SICCARDI, 1966; HARDY, 1981).

O número de cópias dos plasmídeos Col por célula é variável. Foram observadas linhagens onde o número é pequeno,

possivelmente devido a algum mecanismo regulatório que mantém a multiplicação do plasmídeo Col, embora em estado autônomo, em fase com a duplicação cromossômica e assegura uma segregação correta durante a divisão celular. Linhagens com 10 ou mais cópias revelam um mecanismo de regulação independente do cromossomo bacteriano (NOMURA, 1967; BIRGE, 1981).

2.2.2 SÍNTESE DAS COLICINAS

A produção de colicina ocorre através de biossíntese letal, que leva invariavelmente à morte todas as células que a produzem (JACOB e cols., 1953; FREDERICQ, 1957). Embora o caráter colicinogênico seja hereditário e estável (FREDERICQ, 1957; HAUDUROY & PAPAVALASSILIOU, 1962; IVANOVICS, 1962), sob condições normais somente poucos representantes de uma linhagem colicinogênica (0,1%) sintetizam espontaneamente colicina por muitas horas, enquanto que nos demais a função do gene estrutural é reprimida (BIRGE, 1981; HARDY, 1981).

A síntese de colicina, apesar de intensamente controlada, pode ser induzida a níveis elevados, através de tratamento com luz ultravioleta ou mitomicina C (GLAZEBROOK e cols., 1983), sendo subsequente liberada para o meio externo, através de lise celular. PUGSLEY & SCHWARTZ (1983) sugeriram que a lise resulta da ação de uma proteína lítica, condicionada pelo plasmídeo Col segundo JAKES & ZINDER (1984), e que possivelmente, em combinação com proteínas citoplasmáticas, forma poros na superfície celular e perturba a estrutura interna e externa da membrana bacteriana.

As colicinas são macromoléculas assimétricas de natureza protéica (DAVIS e cols., 1969), associadas eventualmente a lipopolissacarídeos da parede celular (REEVES, 1965; HARDY, 1975). Não está claro se essa associação é simplesmente fortuita ou intrínseca para o mecanismo de liberação de determinadas colicinas, já que a atividade colicinogênica está ligada à fração protéica. Algumas colicinas são liberadas na forma de um complexo protéico, constituído por duas proteínas. A maior das subunidades é responsável pela lesão, que eventualmente leva à morte as células sensíveis, enquanto que a molécula menor confere às bactérias produtoras imunidade a sua própria colicina. Esse complexo protéico mostra-se com maior efeito bactericida em comparação à subunidade maior isoladamente (HARDY, 1981).

A primeira classificação sistemática das colicinas foi proposta por Fredericq em 1948 (citado por REEVES, 1965), com base na especificidade de adsorção a receptores específicos e conseqüente isolamento de mutantes resistentes, agrupando as colicinas em 17 tipos denominados de A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, S1, S2, S3, S4, S5 e V; e em subtipos segundo a sua especificidade imunológica (NOMURA, 1967). Posteriormente, HAMON & PÉRON (1964) descreveram novos tipos de colicinas, que pelas suas características receberam as seguintes denominações: E4, N, P, V2, V3, V4 e V5. Um método alternativo, que serve de base à atual classificação, constitui-se na determinação da atividade das moléculas colicinogênicas frente a um painel de bactérias, cuja resistência a colicinas é conhecida (BRODA, 1979), possibilitando a distinção de no-

vos tipos, a exemplo da reclassificação da colicina E em E1 a E7 (MALES & STOCKER, 1982).

A nomenclatura adotada para designar as colicinas e os fatores colicinogênicos indica o tipo de colicina produzida e a linhagem bacteriana originalmente produtora (REEVES, 1965; HARDY, 1981). Dessa forma, colicina CA 23-D significa colicina do tipo D produzida pela linhagem *E. coli* CA 23.

As colicinas são produzidas por linhagens colicinogênicas selvagens ou recombinantes, estas últimas obtidas através da transferência do plasmídeo Col a linhagens originariamente não colicinogênicas (NOMURA, 1967). Uma linhagem colicinogênica pode sintetizar diferentes colicinas simultaneamente (CHABBERT, 1950), condicionadas por um ou mais plasmídeos Col (HARDY, 1981). Do mesmo modo, uma célula susceptível pode apresentar sensibilidade a várias colicinas, determinada pela presença de uma série de receptores específicos (FREDERICQ, 1957; NOMURA, 1964; VOSTI, 1968).

2.2.3 AÇÃO BACTERICIDA DAS COLICINAS

NOMURA (1964) sugeriu que o mecanismo de ação das colicinas envolve inicialmente a interação física de uma unidade letal de colicina com o receptor específico da célula susceptível, decorrendo daí uma mudança no sítio receptor, sem necessariamente causar um efeito direto no alvo bioquímico. Essa fase é caracterizada por ser passível de reversão por tripsina (PLATE & LURIA, 1972) e não ser ATP-dependente (GARCIA e cols., 1982), correspondendo ao estágio I menciona-

do por BIRGE (1981) com referência ao mecanismo de ação das colicinas.

Desde que a célula sensível pode adsorver muitas unidades letais e desde que existem diferentes mudanças bioquímicas para diferentes concentrações de colicinas, parece haver muitos receptores em uma célula.

A interação física decorrente da adsorção da colicina a receptores na célula bacteriana foi primeiramente observada, através da utilização de colicina radioativa, por MAEDA & NOMURA (1966). Esses receptores específicos estão localizados na parede celular (DAVIS e cols., 1969; SABET & SCHNAITMAN, 1971), na membrana citoplasmática (ŠMARDA & TAUBENECK, 1968) ou em ambas (ŠMARDA, 1975).

Muitos desses receptores parecem estar relacionados com importantes funções fisiológicas bacterianas, tais como captação de ferro e vitamina B₁₂, as quais exercem uma pressão seletiva para a manutenção de receptores ativos na superfície de organismos sensíveis (KONISKY, 1982). Embora os receptores específicos sejam essenciais para a ação das colicinas em células intactas, estes podem ser desnecessários, se partes da parede celular forem removidas ou rompidas, permitindo às colicinas o acesso a regiões internas da membrana citoplasmática. Assim, células intactas resistentes a uma determinada colicina podem ter seus correspondentes esferoplastos sensíveis à mesma (HARDY, 1981).

A unidade letal é definida como sendo a quantidade de moléculas de colicina necessárias para matar uma célula susceptível (NOMURA, 1967), podendo corresponder a uma (JACOB e

cols., 1952; NOMURA, 1963, 1964; REEVES, 1965; DAVIS e cols., 1969) ou a muitas moléculas (MAEDA & NOMURA, 1966). Uma célula susceptível pode adsorver até 11 (MAYR-HARTING, 1964); 20 a 30 (MAEDA & NOMURA, 1966); ou 30 a 90 unidades letais (REEVES, 1965).

A transmissão específica da interação ao alvo bioquímico e/ou bactericida, presumivelmente, ocorre através de um sistema localizado ao longo da membrana citoplasmática, resultando na expressão de efeitos bioquímicos na superfície celular e a nível intracelular, que levam à morte bacteriana. Essa seqüência de eventos corresponde ao estágio II referido por BIRGE (1981).

Esse mecanismo bactericida parece envolver uma ação indireta da colicina, já que NOMURA (1963, 1964), LURIA (1964) e MAEDA & NOMURA (1966) sugeriram que a mesma permanece adsorvida ao sítio receptor, atuando primariamente na membrana citoplasmática, através de conexões físicas com a mesma ou como parte integrante dela.

Alguns autores sugeriram um mecanismo alternativo para explicar a ação das colicinas, onde ocorre a penetração das moléculas no interior da célula, atingindo o alvo bactericida. Para BIRGE (1981), o receptor facilita a penetração da colicina através da parede celular e da membrana citoplasmática, despolarizando esta última e afetando a síntese de ATP. Além desses efeitos, HARDY (1981) acrescentou que algumas colicinas, após sofrerem fracionamento, atuam como nucleases, catalisando reações de degradação de DNA e RNA. Segundo WATSON & SHERATT (1979), a colicina adsorvida ao re-

ceptor é clivada e um fragmento C-terminal ativo penetra no interior da célula e exerce seu efeito sobre os ribossomos.

CHANGEUX & THIÉRY (1967) propuseram que a adsorção da colicina na superfície celular induz alterações conformacionais nas unidades protoméricas que constituem a membrana citoplasmática. Em consequência das interações cooperativas entre os protômeros, as mudanças conformacionais se propagam seqüencialmente através da membrana, interferindo indiretamente na síntese protéica.

A ação das colicinas em bactérias sensíveis parece não envolver lise celular, sendo definidas como agentes bactericidas e não bacteriolíticos (FREDERICQ, 1957, 1963). A propósito da linhagem *E. coli* ML que libera colicina e causa lise celular, estudada por JACOB e cols. (1952), posteriormente Kellenberger & Kellenberger em 1956 (citados por FREDERICQ, 1957; IVÁNOVICS, 1962) caracterizaram a presença concomitante do caráter colicinogênico e lisogênico na linhagem. Com relação à colicina N, o seu modo de ação aparentemente incomum, revelando uma atividade lítica, segundo PUGSLEY (1984), requer uma investigação mais detalhada.

As colicinas exercem sua ação em células sensíveis atingindo diferentes alvos bioquímicos. Três tipos básicos de ação bioquímica podem ser reconhecidos: (a) degradação do DNA bacteriano, p.ex., colicina E2 (NOMURA, 1963; KONISKY, 1982); (b) inibição da síntese protéica, p.ex., colicinas E3 e D (NOMURA, 1963; BOWMAN e cols., 1971); e (c) inibição da síntese macromolecular total, p.ex., colicinas E1, K, Ia, Ib e A (NOMURA, 1963; NAGEL DE ZWAIG, 1969; KAYALAR & LURIA, 1979;

TOKUDA & KONISKY, 1979; KONISKY, 1982).

FINCHAM (1965) qualificou as colicinas como meras toxinas que levam à morte células susceptíveis e as diferenciou dos bacteriófagos, por não representarem uma entidade genética independente capaz de se multiplicar e de se transmitir em série. No entanto certas colicinas mostram-se comparáveis a bacteriófagos defectivos ao apresentarem receptores comuns para a sua adsorção à célula susceptível (FREDERICQ & BETZ-BAREAU, 1952; FREDERICQ, 1953; IVÂNOVICS, 1962) e ao sofrerem indução através de irradiação com luz ultravioleta (HAMON & LEWE, 1955; FREDERICQ, 1957; OZEKI e cols., 1959; AMATI, 1964; DAVIS e cols., 1969; HARDY, 1981). Para REEVES (1965) e ŠMARDA & SCHUHMANN (1967), a sensibilidade análoga de algumas linhagens bacterianas frente a certas colicinas e fagos não pode ser explicada simplesmente através da suposição de receptores comuns.

A ação bactericida das colicinas, através do processo de único toque ("single-hit"), não requer uma função cooperativa de muitas partículas, ou seja, uma única unidade letal, com uma certa probabilidade, leva à morte a célula susceptível. O processo de único toque foi primeiramente demonstrado em *E. coli* ML por JACOB e cols. (1952) e confirmado por NOMURA (1963, 1964), REEVES (1965), WENDT (1970) e KONISKY (1982). Assim, as colicinas se comportam como partículas cuja ação bactericida pode ser ensaiada em termos do número de unidades letais, que, não necessariamente, pode corresponder ao número real de moléculas adsorvidas. Para HARDY (1975) e KONISKY (1982), essa desproporção pode estar relacionada com

a presença de moléculas inativas de colicina ou receptores não efetivos.

Hipótese contrária, sugerindo que a ação bactericida das colicinas ocorre através do processo de múltiplos toques ("multiple-hit"), foi proposta por FREDERICQ (1952).

2.2.4 IMUNIDADE E RESISTÊNCIA

A linhagem colicinogênica sobrevive à colicina homóloga devido à presença de uma imunidade específica, conferida possivelmente pelo plasmídeo Col. Essa imunidade não envolve a perda de receptores, aos quais as moléculas de colicina efetivamente se adsorvem (FREDERICQ, 1957; NOMURA, 1964; MAEDA & NOMURA, 1966) e raramente é completa, uma vez que elevadas concentrações de colicina homóloga podem afetar a correspondente linhagem (NOMURA, 1964).

A imunidade parece estar relacionada com uma alteração no mecanismo responsável pela iniciação e/ou transmissão de estímulos específicos que afetam o alvo nas células sensíveis (NOMURA, 1964), provavelmente como resultado da síntese de uma proteína que confere imunidade à célula (HARDY, 1981).

Com referência a colicinas heterólogas, NOMURA (1964) observou a existência de mutantes resistentes que adsorvem uma determinada colicina, mas permanecem resistentes a sua ação. Pesquisas subseqüentes levaram à distinção de dois tipos de mutantes resistentes: mutantes que perderam os receptores específicos e mutantes com receptores, mas resisten-

tes à ação da colicina. Estes últimos foram denominados de mutantes tolerantes e foram classificados, por sua vez, em três grupos: (a) mutantes com alteração no mecanismo de iniciação de estímulos; (b) mutantes com alteração no mecanismo de transmissão de estímulos ou de penetração da colicina adsorvida; e (c) mutantes com alteração no alvo (NOMURA, 1967; FERBER e cols., 1981).

2.2.5 PAPEL SELETIVO DAS COLICINAS

Para FREDERICQ (1957), BRANCHE e cols. (1963), FINCHAM (1965), ARAI & KOMATSU (1981) e HARDY (1981), as colicinas parecem conferir vantagem seletiva às linhagens que são potencialmente capazes de sintetizá-las, ao levarem à morte outras linhagens que compartilham do mesmo nicho ecológico. Entretanto a coexistência de populações sensível e colicinogênica no trato intestinal dificulta a atribuição de vantagem ecológica às colicinas (CHAO & LEVIN, 1981).

VOSTI (1968), estudando a propriedade colicinogênica de linhagens de *E. coli* classificadas serologicamente, observou que a produção de colicinas não interfere na aquisição e implantação de novas linhagens. Em concordância, SILVA e cols. (1983) sugeriram que as colicinas não constituem fatores de virulência em amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas. Os trabalhos de SEARS e cols. (1950) e SEARS & BROWNLEE (1952) demonstraram que a atividade antagonista de linhagens de *E. coli* localizadas no trato intestinal, classificadas como residentes, não era maior do que das linhagens

transitórias ou das linhagens isoladas de fontes extra-intestinais.

Trabalhos experimentais têm sugerido que as colicinas não contribuem para a implantação de linhagens colicinogênicas no intestino, por serem provavelmente inativadas por enzimas proteolíticas (BRAUDE & SIEMIENSKI, 1965; KELSTRUP & GIBBONS, 1969), ou por estarem presentes em condições inadequadas para eliminar organismos sensíveis (RICHARDSON e cols., 1971).

No entanto FREDERICQ (1957) observou que a frequência de bactérias colicinogênicas é maior em indivíduos com infecções entéricas comparativamente a indivíduos sãos.

Evidências sobre o papel ativo das colicinas em infecções extra-intestinais, particularmente do trato urinário, foram apresentadas por BRAUDE & SIEMIENSKI (1965, 1968) e por HARDY (1975).

Contrariamente a essa posição, HUGHES e cols. (1982) observaram que as colicinas, especialmente a colicina V, não estão associadas significativamente com a resistência sérica de *E. coli* isolada de infecções urinárias.

No Brasil, SOUZA (1975) demonstrou maior tendência à capacidade de produção de colicinas nas amostras de *E. coli* isoladas de fezes comparativamente às de urina, sugerindo que a colicinogenia confere vantagem seletiva às produtoras em ambiente altamente competitivo. Adicionalmente, observou uma associação entre capacidade colicinogênica e resistência a drogas, particularmente à tetraciclina.

BIAGI (1982), analisando amostras fitopatogênicas, não detectou relação entre capacidade bacteriocinogênica, resistência a drogas e local de origem dos isolados.

SANT'ANA & SOUZA (1985) observaram uma associação entre produção de colicinas e resistência à tetraciclina, em amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de córregos-es-gotos de Belo Horizonte, Minas Gerais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina (64 amostras) e fezes (56 amostras) de 120 pacientes ambulatoriais e domiciliares, com idade entre 0 e 15 anos, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e Hospital Pequeno Príncipe, durante o período de agosto a dezembro de 1983.

A linhagem *E. coli* K12, cedida pelo Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, foi empregada como receptora no processo de conjugação e indicadora na verificação de produção de colicinas.

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

- CALDO NUTRIENTE

| | |
|----------------------------|----------|
| Nutrient broth (BBL) | 8,0 g |
| Água destilada | 1 000 ml |

• ÁGAR NUTRIENTE SÓLIDO

| | |
|-----------------------------|----------|
| Nutrient agar (MERCK) | 20,0 g |
| Água destilada | 1 000 ml |

• ÁGAR NUTRIENTE SEMI-SÓLIDO

| | |
|------------------------------------|----------|
| Agar bacteriological (DIFCO) | 7,5 g |
| Caldo nutriente | 1 000 ml |

• MEIO DE EOSINA—AZUL-DE-METILENO (EMB)

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Eosin methylene blue agar (BBL) | 36,0 g |
| Água destilada | 1 000 ml |

• SOLUÇÃO SALINA 0,85%

| | |
|---------------------------------|----------|
| Cloreto de sódio (REAGEN) | 8,5 g |
| Água destilada | 1 000 ml |

• SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 0,1 N

| | |
|----------------------------------|----------|
| Hidróxido de sódio (MERCK) | 4,0 g |
| Água destilada | 1 000 ml |

• SOLUÇÃO DE METANOL 10% (v/v)

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Metanol (MERCK) | 10 ml |
| Água destilada esterilizada | 90 ml |

3.3 DROGAS¹

Ácido nalidíxico (Nx) - Winthrop Products Inc.

Ampicilina sódica (Ap) - Laboratórios Lepetit S.A.

Cloranfenicol (Cm) - Farmitalia Carlo Erba S.A.

Sulfato de amicacina (Am) - Laborterápica Bristol S.A.

Sulfato de canamicina (Km) - Laborterápica Bristol S.A.

Sulfato de estreptomicina (Sm) - Indústrias Farmacêuticas Fontoura-Wyeth S.A.

Sulfato de gentamicina (Ge) - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.

Tetraciclina (Te) - Laborterápica Bristol S.A.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE DROGAS

A Tabela 1 apresenta os solventes utilizados no preparo das soluções de drogas (BIAGI, 1980).

TABELA 1. Preparo das soluções de drogas.

| DROGAS | SOLVENTES |
|---------------------------|------------------------------------|
| Ácido nalidíxico | Solução de hidróxido de sódio 0,1N |
| Ampicilina sódica | Água destilada esterilizada |
| Cloranfenicol | Solução de metanol 10% (v/v) |
| Sulfato de amicacina | Água destilada esterilizada |
| Sulfato de canamicina | Água destilada esterilizada |
| Sulfato de estreptomicina | Água destilada esterilizada |
| Sulfato de gentamicina | Água destilada esterilizada |
| Tetraciclina | Solução de metanol 10% (v/v) |

¹O termo droga refere-se, no presente trabalho, a agentes antimicrobianos de natureza quimioterápica e antibiótica.

3.5 ESTERILIZAÇÃO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações dos fabricantes, tendo sido esterilizados em autoclave a 120°C e a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

A temperatura de incubação foi de 37°C em todos os experimentos.

3.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As amostras bacterianas foram coletadas a partir de dois materiais biológicos distintos: urina e fezes. O isolamento e identificação das bactérias, através de características morfológicas, provas bioquímicas e sorológicas, foram realizados nos laboratórios de bacteriologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e Hospital Pequeno Príncipe.

3.7 SELEÇÃO, NUMERAÇÃO E ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS

Dentre as bactérias isoladas a partir de urina, foram selecionadas amostras de *E. coli* causadoras de infecção urinária, cuja contagem de colônias em urinocultura foi igual ou superior a 10^5 /ml. As amostras de *E. coli* de origem fecal foram constituídas por integrantes da flora intestinal normal.

A numeração das amostras obedeceu à ordem de seleção, sendo os números atribuídos às mesmas antecidos pelas letras U (urina) ou F (fezes), indicativas do respectivo material biológico de origem.

A estocagem foi feita em duplicata em frascos contendo ágar nutriente semi-sólido.

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA

Os níveis de resistência foram determinados pela técnica de diluição em placas (TRABULSI & ZULIANI, 1969). As soluções das drogas e as placas de Petri contendo ágar nutriente foram preparadas no momento do uso. As quantidades determinadas de ágar nutriente a 45°C foram adicionadas às soluções das drogas a fim de se obterem as concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1 000 µg da droga por mililitro de meio de cultura.

As amostras bacterianas foram inoculadas em caldo nutriente, incubadas por um período de 18 a 20 horas e semeadas com replicador multialça composto por 17 unidades, em placas contendo diferentes concentrações das drogas. A viabilidade das amostras foi observada semeando-se em placas contendo unicamente ágar nutriente isento de drogas.

A leitura das placas foi feita após incubação de 24 horas e os resultados anotados. Considerou-se como concentração inibitória mínima a menor concentração da droga que impediu o crescimento da amostra bacteriana e como nível de

resistência a concentração imediatamente inferior (MORENO, 1972).

3.9 CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas foram classificadas em sensíveis ou resistentes frente a uma determinada droga, segundo o método descrito por TRABULSI e cols. (1970).

Os níveis de resistência das 120 amostras de *E. coli* para cada uma das oito drogas ensaiadas foram agrupados, ordenados segundo uma distribuição de frequência e representados graficamente. Tratando-se de curvas bimodais ou aproximadamente bimodais, as amostras situadas à direita da anti-moda, que correspondiam aos maiores níveis de resistência, foram classificadas como resistentes; as amostras localizadas à esquerda, que correspondiam aos menores níveis de resistência, foram classificados como sensíveis.

3.10 TRANSFERÊNCIA DAS MARCAS DE RESISTÊNCIA

A pesquisa de transferência das marcas de resistência foi realizada através do processo de conjugação, de acordo com a técnica modificada de MORENO (1972), utilizando-se como receptora *E. coli* K12, possuidora das seguintes características:

- a) incapacidade fermentativa da lactose;
- b) nível de resistência de 500 $\mu\text{g/ml}$ à estreptomicina;
- c) nível de resistência de 1 $\mu\text{g/ml}$ à ampicilina;
- d) nível de resistência inferior a 1 $\mu\text{g/ml}$ à canamicina, tetraciclina e ao cloranfenicol.

A seleção das amostras possivelmente doadoras foi subordinada à determinação preliminar de sua capacidade fermentativa da lactose e à determinação de seus níveis de resistência à ampicilina, canamicina, estreptomicina, tetraciclina e ao cloranfenicol, variando-se as concentrações das drogas de 1 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Nessas condições, foram selecionadas como doadoras aquelas amostras que mais se adequaram aos critérios de sensibilidade à estreptomicina e resistência às demais drogas classificadas conforme item 3.9. Esses critérios foram estabelecidos por serem diferenciadores entre as amostras receptora e doadoras, e permitirem a caracterização das bactérias recombinantes em meios seletivos adequados.

A amostra receptora e as possíveis doadoras selecionadas foram cultivadas isoladamente em caldo nutriente por um período de 18 a 20 horas. Em seguida, 0,9 ml e 0,1 ml respectivamente das culturas das amostras receptora e doadoras foram inoculados em 10 ml de caldo nutriente e incubados sem agitação. Após um período de 4 a 6 horas, alíquotas da cultura mista foram semeadas em placas controles e seletivas. O mesmo procedimento foi repetido aumentando-se o período de incubação da cultura mista para 18 a 20 horas. A leitura das placas foi feita após 24 horas de incubação.

As placas controles e seletoras foram feitas empregando-se o meio de eosina—azul-de-metileno (EMB), adicionado de soluções de drogas preparadas no momento do uso e discriminadas como:

placa EMB - isenta de drogas;

placa EMB+Sm - 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina;

placa EMB+Sm+Ap - 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina;

placa EMB+Sm+Cm - 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol;

placa EMB+Sm+Km - 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 2 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina;

placa EMB+Sm+Te - 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina.

3.11 PRODUÇÃO DE COLICINAS

Com a finalidade de se verificar a produção de colicinas nas 120 amostras de *E. coli* frente à linhagem indicadora de *E. coli* K12, procedeu-se de acordo com a técnica modificada de COSTA (1973).

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas por 48 horas. Após esse período, sofreram irradiação de luz ultravioleta por 10 segundos e foram reincubadas por 24 horas. Posteriormente, as placas foram invertidas e 1,0 ml de clorofórmio foi colocado na tampa de cada uma delas, para esterilização das culturas. Decor-

ridos 15 minutos, as placas foram entreabertas por 30 minutos para eliminação total do clorofórmio residual.

Adicionou-se às placas 5,0 ml de ágar nutriente semi-sólido a 45°C previamente inoculado com *E. coli* K12, de modo a se obter uma delgada película homogênea sobre as colônias ensaiadas. Após incubação de 24 horas, observou-se a presença ou ausência de halo de inibição.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através da aplicação do teste de qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher em análises de independência, para averiguar se os desvios observados ocorreram ao acaso, e emprego do coeficiente de correlação fi (ϕ), como medida do grau de associação de variáveis.

O teste de χ^2 foi aplicado às tabelas de contingência que obedeciam aos requisitos estabelecidos por Cochran em 1954 (citado por GOMES, 1966), para assegurar a validade da prova, aplicando-se também a correção de Yates (LEVIN, 1978), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \frac{N (|AD-BC| - N/2)^2}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}$$

onde:

A, B, C, D = frequências observadas em tabelas de contingência;

N = número total da amostra.

Nas tabelas foi utilizada a simbologia usual para os níveis de probabilidade dos testes estatísticos empregados, como abaixo:

ns = não significativo;

* = significativo ao nível de 0,05;

** = significativo ao nível de 0,01;

*** = significativo ao nível de 0,001.

A tabela de contingência, cuja frequência esperada mostrou ser inferior a 1, invalidando o emprego do teste de χ^2 , foi aplicado o teste exato de Fisher (GOMES, 1966; SIEGEL, 1975), baseado exclusivamente no cálculo das probabilidades, conforme se segue:

$$p = \frac{(A+B)! (C+D)! (A+C)! (B+D)!}{N!} \frac{1}{A! B! C! D!}$$

onde:

A, B, C, D = frequências observadas em tabelas de contingência;

N = número total da amostra.

O coeficiente ϕ foi empregado para estabelecer a correlação entre variáveis mensuradas a nível nominal, calculado através da aplicação da fórmula.

$$\phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{N}}$$

onde:

χ^2 = qui-quadrado observado (calculado);

N = número total da amostra.

Os valores que o coeficiente \emptyset pode assumir oscilam entre -1,00 e +1,00 e foram interpretados segundo LEVIN (1978).

A significância estatística do coeficiente \emptyset foi determinada mediante o teste de χ^2 , porquanto é uma simples extensão deste.

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE RESISTÊNCIA

A Tabela 2 apresenta os níveis de resistência, enquanto a Tabela 3 e as Figuras 1 a 8 mostram a frequência para cada nível de resistência das 120 amostras de *E. coli* frente a oito drogas.

TABELA 2. Níveis de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas.

| AMOSTRAS | DROGAS ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|-------|-------|-----------------|-----|----|----|-----|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te |
| U01 | 1 | 1 000 | 1 000 | <1 ^a | 10 | 1 | <1 | 50 |
| U02 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U03 | <1 | 2 | 50 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U04 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 200 | 5 | 2 | 50 |
| U05 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U06 | 20 | 2 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U07 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 5 | <1 | 50 |
| U08 | <1 | 1 | 10 | <1 | <1 | 10 | <1 | 5 |
| U09 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 10 | 2 | 2 | 200 |
| U10 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 2 | <1 | <1 |
| U11 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| U12 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 50 | 10 | 10 | 50 |
| U13 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| U14 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | 10 | 10 | <1 | 50 |
| U15 | <1 | 1 | 1 000 | <1 | 10 | <1 | <1 | 20 |
| U16 | <1 | <1 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| U17 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U18 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U19 | <1 | 1 000 | 1 000 | 1 | 100 | 20 | <1 | 50 |
| U20 | <1 | 500 | 1 000 | <1 | 10 | 2 | <1 | 50 |
| U21 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 50 |
| U22 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U23 | <1 | 500 | 1 000 | <1 | <1 | 2 | <1 | 50 |
| U24 | <1 | 500 | 1 000 | <1 | 20 | 10 | <1 | 20 |
| U25 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 50 |
| U26 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U27 | 1 | 1 000 | 200 | <1 | 50 | 2 | 5 | 100 |
| U28 | <1 | 5 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U29 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 50 | 10 | <1 | 50 |
| U30 | <1 | 1 000 | 50 | <1 | 10 | 10 | <1 | <1 |
| U31 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | 5 | <1 | 20 |
| U32 | <1 | 5 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | 20 |
| U33 | <1 | 1 | 20 | <1 | <1 | 5 | <1 | <1 |
| U34 | 50 | 1 000 | 50 | <1 | <1 | <1 | <1 | 20 |
| U35 | 2 | 1 000 | 1 000 | <1 | 10 | 5 | 1 | 20 |
| U36 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | 100 |
| U37 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U38 | 1 | 500 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 50 |
| U39 | 1 | 500 | 20 | <1 | 2 | <1 | <1 | 100 |
| U40 | 1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |

TABELA 2. *Continuação.*

| AMOSTRAS | DROGAS ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|-------|-------|----|-------|----|----|-----|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te |
| U41 | <1 | 1 | 50 | <1 | <1 | 20 | <1 | <1 |
| U42 | 1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 50 | 2 | 2 | 100 |
| U43 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | <1 |
| U44 | 1 | 1 000 | 200 | <1 | 50 | 2 | 2 | 100 |
| U45 | <1 | <1 | 500 | <1 | <1 | <1 | <1 | 20 |
| U46 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 10 | 10 | <1 | 20 |
| U47 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U48 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 1 | <1 | 50 |
| U49 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| U50 | <1 | 1 | 20 | <1 | <1 | 1 | <1 | 50 |
| U51 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U52 | 1 | 500 | 1 000 | 5 | 5 | 10 | 1 | 200 |
| U53 | <1 | 500 | 1 000 | <1 | 5 | <1 | <1 | <1 |
| U54 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U55 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 5 | 2 | <1 | 50 |
| U56 | <1 | 2 | 50 | <1 | <1 | 10 | <1 | 2 |
| U57 | 1 | 500 | 1 000 | <1 | 5 | 10 | <1 | 200 |
| U58 | 1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 5 | 20 | <1 | 500 |
| U59 | 1 | 200 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 200 |
| U60 | 1 | 500 | 1 000 | <1 | <1 | 10 | <1 | 100 |
| U61 | 1 | 200 | 1 000 | <1 | 5 | 5 | <1 | 50 |
| U62 | <1 | 2 | 20 | <1 | 2 | <1 | <1 | <1 |
| U63 | <1 | 10 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| U64 | 2 | 2 | 100 | <1 | <1 | 1 | <1 | 10 |
| F01 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | 100 |
| F02 | 50 | 100 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | 2 |
| F03 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F04 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 1 000 | 10 | <1 | 100 |
| F05 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F06 | <1 | 2 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | 50 |
| F07 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F08 | <1 | 1 000 | 1 000 | 1 | 50 | 5 | <1 | 100 |
| F09 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F10 | 1 | 20 | 50 | <1 | <1 | <1 | <1 | 1 |
| F11 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | 50 |
| F12 | <1 | 5 | 1 000 | <1 | <1 | <1 | <1 | 50 |
| F13 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F14 | 2 | 1 000 | 1 000 | <1 | 20 | 2 | 2 | 50 |
| F15 | 1 | 1 000 | 20 | 1 | 5 | 2 | <1 | <1 |
| F16 | <1 | 10 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |

TABELA 2. *Conclusão.*

| AMOSTRAS | DROGAS ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|-------|-------|----|----|----|----|-----|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te |
| F17 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F18 | 100 | 500 | 1 000 | <1 | 1 | 2 | <1 | 100 |
| F19 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | 5 | <1 | <1 |
| F20 | <1 | 5 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F21 | 2 | 2 | 20 | <1 | <1 | 1 | <1 | 20 |
| F22 | <1 | 2 | 20 | <1 | 10 | 2 | <1 | 50 |
| F23 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F24 | 1 | 500 | 1 000 | <1 | 10 | 10 | <1 | 200 |
| F25 | 1 | 500 | 1 000 | <1 | 10 | 10 | 2 | 200 |
| F26 | 1 | 100 | 1 000 | <1 | 5 | 10 | <1 | 50 |
| F27 | 1 | 200 | 1 000 | <1 | 10 | 10 | <1 | 200 |
| F28 | <1 | 20 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | 200 |
| F29 | 1 | 100 | 1 000 | <1 | 5 | 10 | <1 | 200 |
| F30 | <1 | 1 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F31 | 100 | 2 | 50 | <1 | <1 | 5 | <1 | 1 |
| F32 | 2 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 1 | <1 | 50 |
| F33 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F34 | 1 | 10 | 50 | <1 | <1 | 1 | <1 | 20 |
| F35 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 1 | <1 | <1 |
| F36 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 2 | <1 | 50 |
| F37 | <1 | 20 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F38 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F39 | 2 | 2 | 100 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| F40 | <1 | 2 | 1 000 | <1 | <1 | 1 | <1 | 50 |
| F41 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 5 | <1 | <1 |
| F42 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | 100 |
| F43 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | <1 | 2 | <1 | <1 |
| F44 | <1 | 1 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F45 | 1 | 2 | 20 | 1 | <1 | 1 | <1 | <1 |
| F46 | 2 | 2 | 50 | <1 | <1 | 10 | <1 | 20 |
| F47 | <1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F48 | <1 | 2 | 500 | <1 | 5 | <1 | <1 | 50 |
| F49 | <1 | 20 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F50 | <1 | 1 000 | 1 000 | <1 | 5 | 1 | <1 | 100 |
| F51 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | 50 |
| F52 | <1 | 2 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F53 | <1 | 500 | 20 | <1 | <1 | 5 | <1 | 50 |
| F54 | 1 | 100 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F55 | 1 | 1 000 | 20 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| F56 | 1 | 2 | 20 | <1 | <1 | 5 | <1 | <1 |

a<1 = menor que 1 $\mu\text{g/ml}$.

TABELA 3. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, dispostas segundo os níveis de resistência apresentados frente a oito drogas.

| NÍVEIS DE RESISTÊNCIA ($\mu\text{g/ml}$) | DROGAS | | | | | | | |
|--|---------------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te |
| <1 | 83(47) ^a | 2(2) | 0 | 115(62) | 83(40) | 45(16) | 110(56) | 47(21) |
| 1 | 25(13) | 7(5) | 0 | 4(1) | 1(0) | 11(4) | 2(2) | 2(0) |
| 2 | 7(2) | 38(14) | 0 | 0 | 2(2) | 14(8) | 6(4) | 2(1) |
| 5 | 0 | 4(2) | 0 | 1(1) | 11(6) | 12(6) | 1(1) | 1(1) |
| 10 | 0 | 3(1) | 1(1) | 0 | 12(8) | 35(27) | 1(1) | 1(1) |
| 20 | 1(1) | 4(0) | 52(21) | 0 | 2(1) | 3(3) | 0 | 17(13) |
| 50 | 2(1) | 0 | 9(5) | 0 | 6(5) | 0 | 0 | 28(16) |
| 100 | 2(0) | 4(0) | 2(1) | 0 | 1(1) | 0 | 0 | 12(6) |
| 200 | 0 | 3(2) | 2(2) | 0 | 1(1) | 0 | 0 | 9(4) |
| 500 | 0 | 13(9) | 2(1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(1) |
| 1 000 | 0 | 42(29) | 52(33) | 0 | 1(0) | 0 | 0 | 0 |

^aOs números entre parênteses referem-se às amostras isoladas de urina.

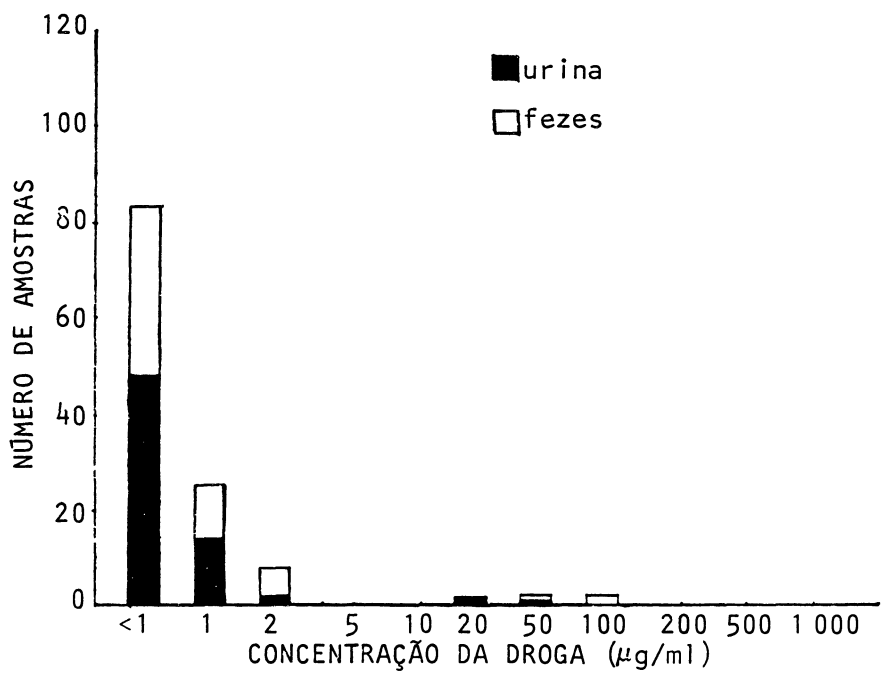


FIGURA 1. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente ao ácido nalidíxico.

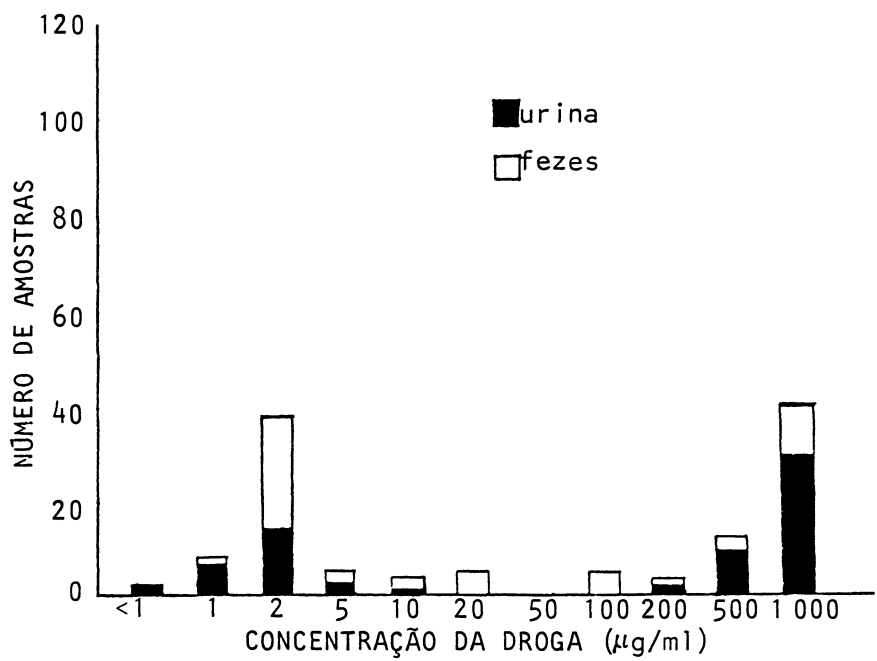


FIGURA 2. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à ampicilina.

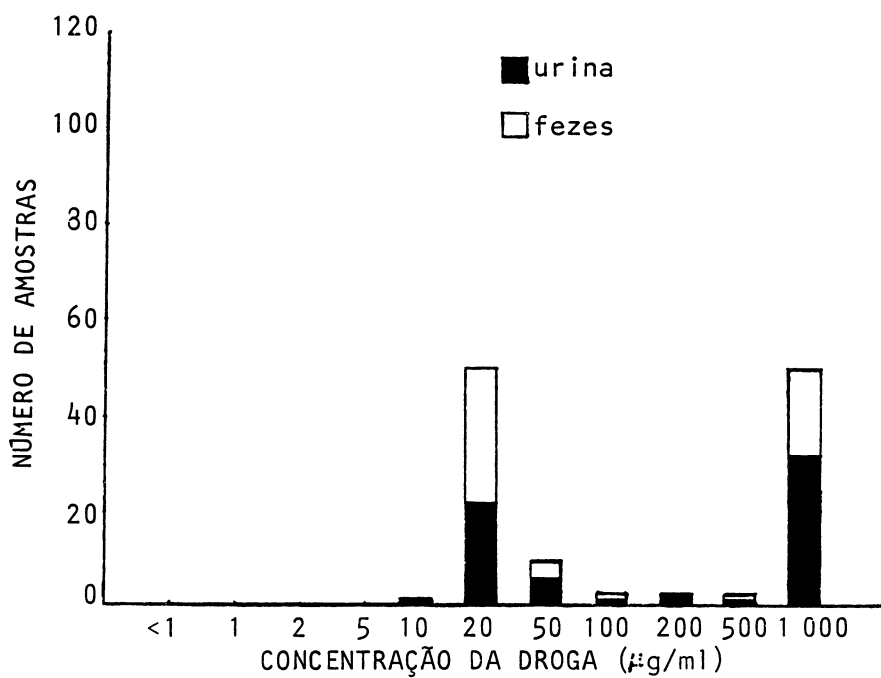


FIGURA 3. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente ao clo-ranfenicol.

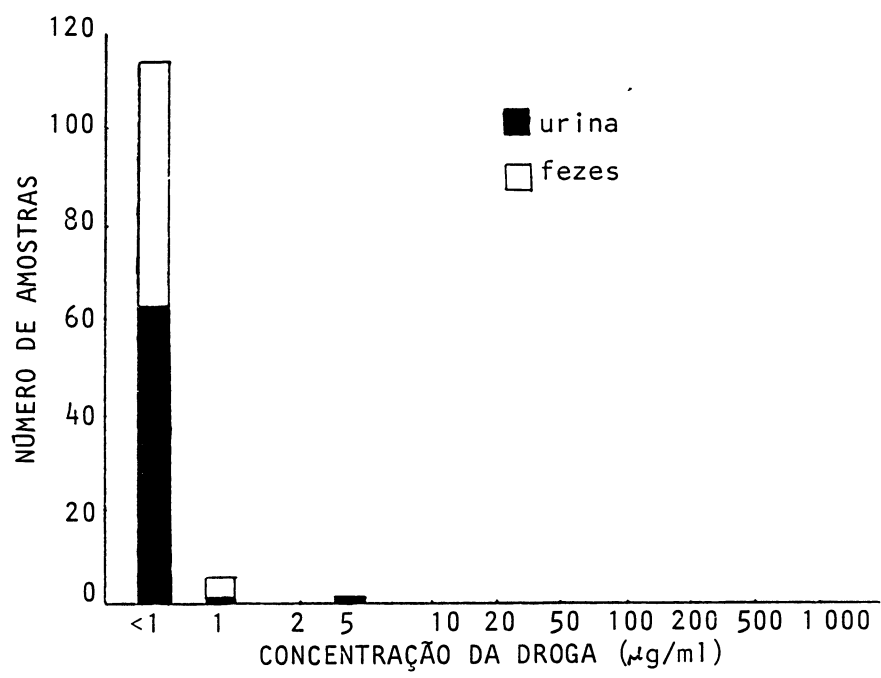


FIGURA 4. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à ami-cacina.

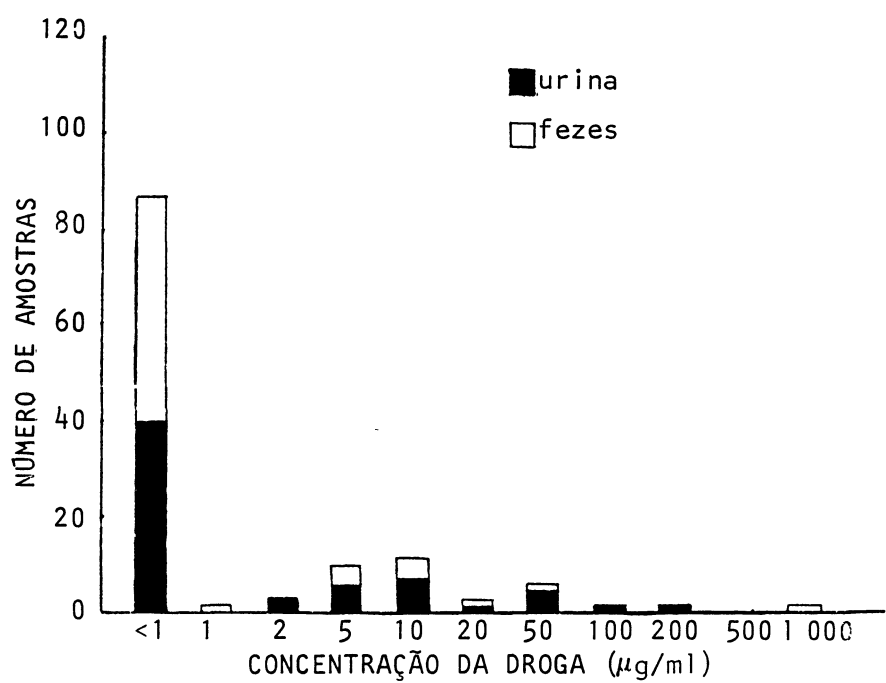


FIGURA 5. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à canamicina.

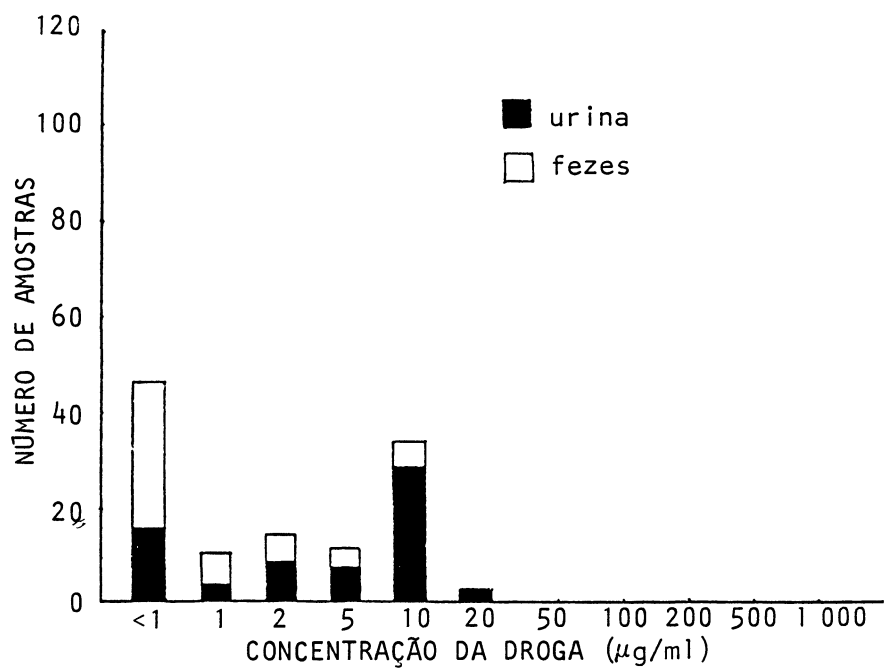


FIGURA 6. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à estreptomicina.

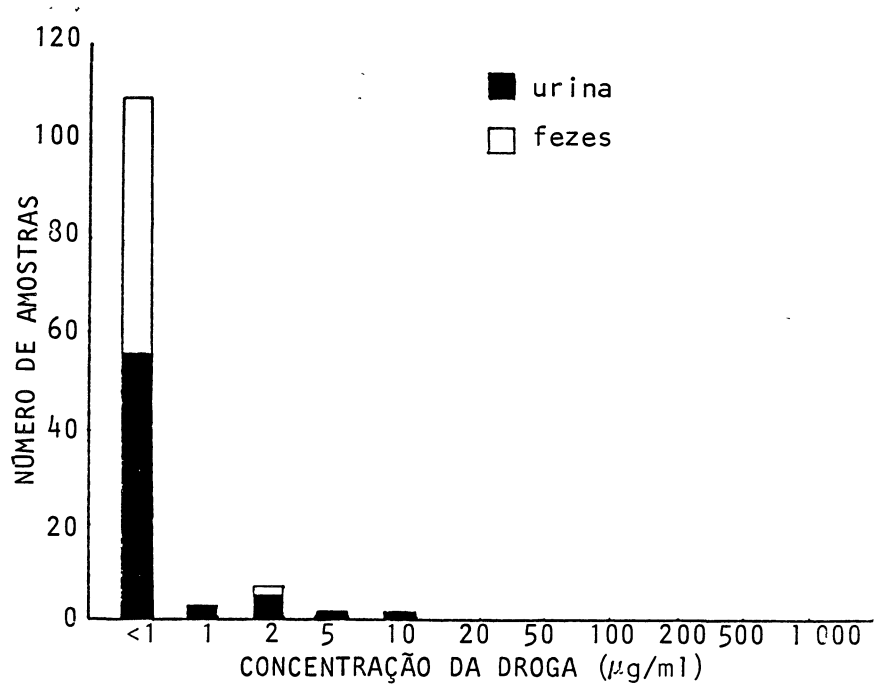


FIGURA 7. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à gentamicina.

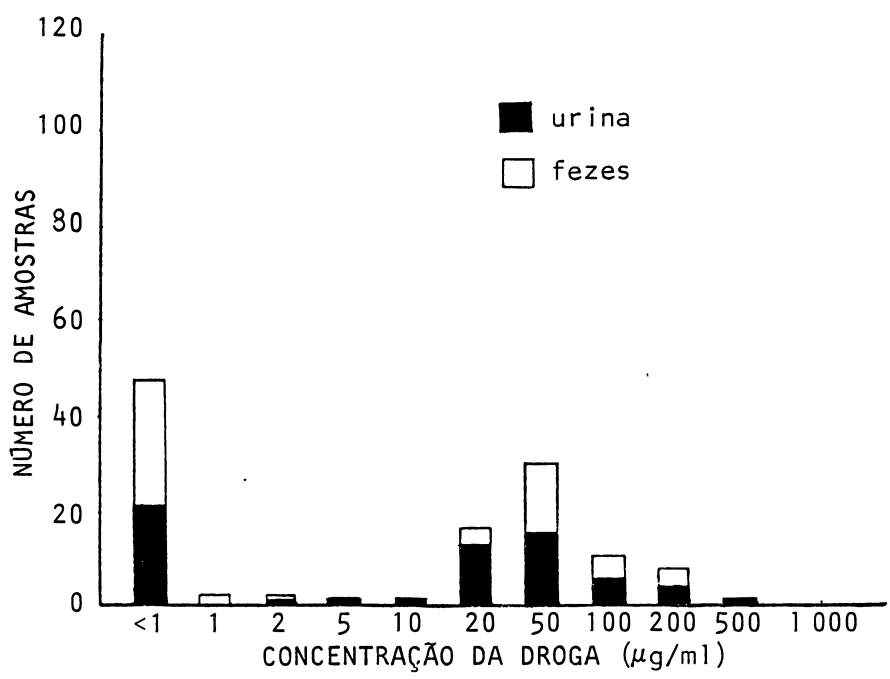


FIGURA 8. Representação gráfica do nível de resistência de 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente à tetraciclina.

4.2 NÍVEIS E MODELOS DE RESISTÊNCIA

Dentre as 120 amostras de *E. coli* isoladas de urina e fezes, 27 delas foram classificadas como sensíveis às drogas ensaiadas, através da análise das Figuras 1 a 8.

Assim, a Tabela 4 relaciona as 93 amostras de *E. coli* resistentes a uma ou mais drogas, apresentando os níveis e modelos de resistência respectivos. Às amostras classificadas como sensíveis a uma droga determinada foi atribuída a letra s e omitido o referido nível de resistência.

TABELA 4. Níveis e modelos de resistência de 93 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas.

| AMOSTRAS | DROGAS (µg/ml) | | | | | | | | MODELOS DE RESISTÊNCIA |
|----------|----------------|-------|-------|----|-----|----|----|-----|------------------------|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te | |
| U01 | s | 1 000 | 1 000 | s | 10 | s | s | 50 | ApCmKmTe |
| U02 | s | 1 000 | s | s | s | 10 | s | s | ApSm |
| U03 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U04 | s | 1 000 | 1 000 | s | 200 | s | 2 | 50 | ApCmKmGeTe |
| U05 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U06 | 20 | s | s | s | s | 10 | s | s | NxSm |
| U07 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | 50 | ApCmTe |
| U08 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U09 | s | 1 000 | 1 000 | s | 10 | s | 2 | 200 | ApCmKmGeTe |
| U10 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | s | ApCm |
| U11 | s | 1 000 | s | s | s | 10 | s | 20 | ApSmTe |
| U12 | s | 1 000 | 1 000 | s | 50 | 10 | 10 | 50 | ApCmKmSmGeTe |
| U13 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | 20 | ApCmSmTe |
| U14 | s | 1 000 | s | s | 10 | 10 | s | 50 | ApKmSmTe |
| U15 | s | s | 1 000 | s | 10 | s | s | 20 | CmKmTe |
| U16 | s | s | 1 000 | s | s | 10 | s | 20 | CmSmTe |
| U17 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U19 | s | 1 000 | 1 000 | s | 100 | 20 | s | 50 | ApCmKmSmTe |
| U20 | s | 500 | 1 000 | s | 10 | s | s | 50 | ApCmKmTe |
| U21 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | 50 | ApCmSmTe |
| U23 | s | 500 | 1 000 | s | s | s | s | 50 | ApCmTe |
| U24 | s | 500 | 1 000 | s | 20 | 10 | s | 20 | ApCmKmSmTe |
| U25 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | 50 | ApCmSmTe |
| U26 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U27 | s | 1 000 | 200 | s | 50 | s | 5 | 100 | ApCmKmGeTe |
| U29 | s | 1 000 | 1 000 | s | 50 | 10 | s | 50 | ApCmKmSmTe |
| U30 | s | 1 000 | s | s | 10 | 10 | s | s | ApKmSm |
| U31 | s | 1 000 | s | s | s | s | s | 20 | ApTe |
| U32 | s | s | 1 000 | s | s | s | s | 20 | CmTe |
| U34 | 50 | 1 000 | s | s | s | s | s | 20 | NxApTe |
| U35 | s | 1 000 | 1 000 | s | 10 | s | s | 20 | ApCmKmTe |
| U36 | s | s | s | s | s | s | s | 100 | Te |
| U38 | s | 500 | 1 000 | s | s | 10 | s | 50 | ApCmSmTe |
| U39 | s | 500 | s | s | 2 | s | s | 100 | ApKmTe |
| U40 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | 20 | ApCmSmTe |
| U41 | s | s | s | s | s | 20 | s | s | Sm |
| U42 | s | 1 000 | 1 000 | s | 50 | s | 2 | 100 | ApCmKmGeTe |
| U43 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | s | ApCmSm |
| U44 | s | 1 000 | 200 | s | 50 | s | 2 | 100 | ApCmKmGeTe |
| U45 | s | s | 500 | s | s | s | s | 20 | CmTe |
| U46 | s | 1 000 | 1 000 | s | 10 | 10 | s | 20 | ApCmKmSmTe |
| U48 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | 50 | ApCmTe |
| U49 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | 10 | s | 20 | ApCmSmTe |
| U50 | s | s | s | s | s | s | s | 50 | Te |
| U51 | s | 1 000 | s | s | s | s | s | s | Ap |
| U52 | s | 500 | 1 000 | 5 | 5 | 10 | s | 200 | ApCmAmKmSmTe |

TABELA 4. *Conclusão.*

| AMOSTRAS | DROGAS (µg/ml) | | | | | | | | MODELOS DE RESISTÊNCIA |
|----------|----------------|-------|-------|----|-------|----|----|-----|------------------------|
| | Nx | Ap | Cm | Am | Km | Sm | Ge | Te | |
| U53 | s | 500 | 1 000 | s | 5 | s | s | s | ApCmKm |
| U55 | s | 1 000 | 1 000 | s | 5 | s | s | 50 | ApCmKmTe |
| U56 | s | s | s | s | s | 10 | s | s | Sm |
| U57 | s | 500 | 1 000 | s | 5 | 10 | s | 200 | ApCmKmSmTe |
| U58 | s | 1 000 | 1 000 | s | 5 | 20 | s | 500 | ApCmKmSmTe |
| U59 | s | 200 | 1 000 | s | s | 10 | s | 200 | ApCmSmTe |
| U60 | s | 500 | 1 000 | s | s | 10 | s | 100 | ApCmSmTe |
| U61 | s | 200 | 1 000 | s | 5 | s | s | 50 | ApCmKmTe |
| U62 | s | s | s | s | 2 | s | s | s | Km |
| U64 | s | s | s | s | s | s | s | 10 | Te |
| F01 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | 100 | ApCmTe |
| F02 | 50 | 100 | 1 000 | s | s | s | s | s | NxApCm |
| F04 | s | 1 000 | 1 000 | s | 1 000 | 10 | s | 100 | ApCmKmSmTe |
| F06 | s | s | 1 000 | s | s | s | s | 50 | CmTe |
| F07 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | s | ApCm |
| F08 | s | 1 000 | 1 000 | s | 50 | s | s | 100 | ApCmKmTe |
| F11 | s | s | s | s | s | s | s | 50 | Te |
| F12 | s | s | 1 000 | s | s | s | s | 50 | CmTe |
| F14 | s | 1 000 | 1 000 | s | 20 | s | 2 | 50 | ApCmKmGeTe |
| F15 | s | 1 000 | s | s | 5 | s | s | s | ApKm |
| F18 | 100 | 500 | 1 000 | s | s | s | s | 100 | NxApCmTe |
| F19 | s | 1 000 | s | s | s | s | s | s | Ap |
| F21 | s | s | s | s | s | s | s | 20 | Te |
| F22 | s | s | s | s | 10 | s | s | 50 | KmTe |
| F24 | s | 500 | 1 000 | s | 10 | 10 | s | 200 | ApCmKmSmTe |
| F25 | s | 500 | 1 000 | s | 10 | 10 | 2 | 200 | ApCmKmSmGeTe |
| F26 | s | 100 | 1 000 | s | 5 | 10 | s | 50 | ApCmKmSmTe |
| F27 | s | 200 | 1 000 | s | 10 | 10 | s | 200 | ApCmKmSmTe |
| F28 | s | s | s | s | s | s | s | 200 | Te |
| F29 | s | 100 | 1 000 | s | 5 | 10 | s | 200 | ApCmKmSmTe |
| F31 | 100 | s | s | s | s | s | s | s | Nx |
| F32 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | 50 | ApCmTe |
| F34 | s | s | s | s | s | s | s | 20 | Te |
| F36 | s | s | s | s | s | s | s | 50 | Te |
| F39 | s | s | s | s | s | 10 | s | 20 | SmTe |
| F40 | s | s | 1 000 | s | s | s | s | 50 | CmTe |
| F41 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | s | ApCm |
| F42 | s | s | s | s | s | s | s | 100 | Te |
| F43 | s | 1 000 | 1 000 | s | s | s | s | s | ApCm |
| F46 | s | s | s | s | s | 10 | s | 20 | SmTe |
| F47 | s | 1 000 | s | s | s | s | s | s | Ap |
| F48 | s | s | 500 | s | 5 | s | s | 50 | CmKmTe |
| F50 | s | 1 000 | 1 000 | s | 5 | s | s | 100 | ApCmKmTe |
| F51 | s | s | s | s | s | s | s | 50 | Te |
| F53 | s | 500 | s | s | s | s | s | 50 | ApTe |
| F54 | s | 100 | s | s | s | s | s | s | Ap |
| F55 | s | 1 000 | s | s | s | s | s | s | Ap |

4.3 NÚMERO E PORCENTAGEM DE AMOSTRAS RESISTENTES E SENSÍVEIS

Nas Tabelas 5, 6 e 7 constam o número e a porcentagem de amostras de *E. coli* isoladas de urina e fezes, classificadas como resistentes e sensíveis frente a oito drogas. A Figura 9 apresenta a porcentagem de amostras resistentes de *E. coli* para cada uma das drogas ensaiadas.

TABELA 5. Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, classificadas como sensíveis, mono e polirresistentes.

| AMOSTRAS | NÚMERO | PORCENTAGEM (%) |
|------------------|--------|-----------------|
| Sensíveis | 27 | 22,50 |
| Monorresistentes | 24 | 20,00 |
| Polirresistentes | 69 | 57,50 |
| TOTAL | 120 | 100,00 |

TABELA 6. Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, classificadas como resistentes e sensíveis, dispostas segundo a droga ensaiada.

| DROGAS | AMOSTRAS | | | |
|--------|-------------|-----------------|-----------|-----------------|
| | RESISTENTES | | SENSÍVEIS | |
| | Número | Porcentagem (%) | Número | Porcentagem (%) |
| Nx | 5 | 4,17 | 115 | 95,83 |
| Ap | 62 | 51,67 | 58 | 48,33 |
| Cm | 56 | 46,67 | 64 | 53,33 |
| Am | 1 | 0,83 | 119 | 99,17 |
| Km | 36 | 30,00 | 84 | 70,00 |
| Sm | 38 | 31,67 | 82 | 68,33 |
| Ge | 8 | 6,67 | 112 | 93,33 |
| Te | 68 | 56,67 | 52 | 43,33 |

TABELA 7. Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* classificadas como resistentes frente a oito drogas e dispostas segundo o material de origem.

| DROGAS | AMOSTRAS RESISTENTES | | | |
|--------|----------------------|-----------------|--------|-----------------|
| | URINA | | FEZES | |
| | Número | Porcentagem (%) | Número | Porcentagem (%) |
| Nx | 2 | 3,12 | 3 | 5,36 |
| Ap | 40 | 62,50 | 22 | 39,28 |
| Cm | 36 | 56,25 | 20 | 35,71 |
| Am | 1 | 1,56 | 0 | 0,00 |
| Km | 24 | 37,50 | 12 | 21,43 |
| Sm | 30 | 46,88 | 8 | 14,28 |
| Ge | 6 | 9,38 | 2 | 3,57 |
| Te | 41 | 64,06 | 27 | 48,21 |

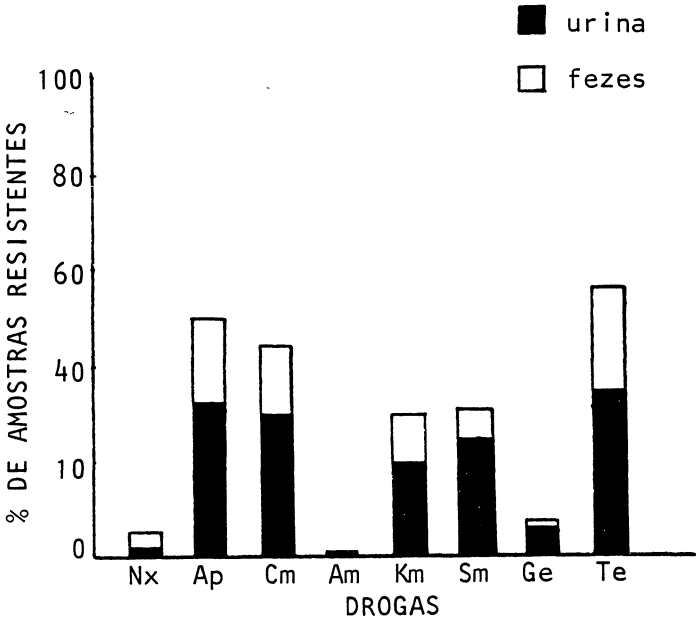


FIGURA 9. Representação gráfica da porcentagem de amostras resistentes de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, frente a oito drogas.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS
E MATERIAL DE ORIGEM

Objetivando determinar se as amostras classificadas como resistentes revelavam uma frequência diferencial em função do material de origem, ordenaram-se os dados que são apresentados nas Tabelas 8 a 17.

TABELA 8. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis frente a oito drogas, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 56 | 37 | 93 |
| Sensíveis | 8 | 19 | 27 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 6,68^{**}$

TABELA 9. Número de amostras de *Escherichia coli* mono e polirresistentes, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|------------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Monorresistentes | 12 | 12 | 24 |
| Polirresistentes | 44 | 25 | 69 |
| TOTAL | 56 | 37 | 93 |

$\chi^2 = 2,04 \text{ ns}$

TABELA 10. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis ao ácido nalidíxico, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 2 | 3 | 5 |
| Sensíveis | 62 | 53 | 115 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 0,02 \text{ ns}$

TABELA 11. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à ampicilina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 40 | 22 | 62 |
| Sensíveis | 24 | 34 | 58 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 5,55^*$

TABELA 12. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis ao cloranfenicol, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 36 | 20 | 56 |
| Sensíveis | 28 | 36 | 64 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 4,27^*$

TABELA 13. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à amicacina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste exato de Fisher.

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 1 | 0 | 1 |
| Sensíveis | 63 | 56 | 119 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

p = 53,33%

TABELA 14. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à canamicina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 24 | 12 | 36 |
| Sensíveis | 40 | 44 | 84 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 2,95$ ns

TABELA 15. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à estreptomicina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 30 | 8 | 38 |
| Sensíveis | 34 | 48 | 82 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 13,19^{***}$

TABELA 16. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à gentamicina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 6 | 2 | 8 |
| Sensíveis | 58 | 54 | 112 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 0,82 \text{ ns}$

TABELA 17. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis à tetraciclina, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|-------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Resistentes | 41 | 27 | 68 |
| Sensíveis | 23 | 29 | 52 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 2,41 \text{ ns}$

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE DROGAS

Na tentativa de se verificar simultaneidade de resistência, drogas para as quais se encontraram 10% ou mais de amostras resistentes foram correlacionadas duas a duas. Desse modo, com base nos dados da Tabela 6, o ácido nalidíxico, a amicacina e a gentamicina não foram levados em consideração por caracterizarem populações essencialmente sensíveis.

Assim, as Tabelas 18 a 27 apresentam as 93 amostras resistentes de *E. coli* submetidas à verificação de correlação entre ampicilina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e tetraciclina. Nas tabelas em que não se observou associação entre variáveis, através da aplicação do teste de χ^2 , foi omitido o respectivo coeficiente ϕ .

TABELA 18. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e ao cloranfenicol, valor do teste de χ^2 e coeficiente ϕ .

| AMPICILINA | CLORANFENICOL | | TOTAL |
|--------------------------------------|---------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 48 | 14 | 62 |
| Sensíveis | 8 | 23 | 31 |
| TOTAL | 56 | 37 | 93 |
| $\chi^2 = 17,86^{***}$ $\phi = 0,44$ | | | |

TABELA 19. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à canamicina, valor do teste de χ^2 e coeficiente ϕ .

| AMPICILINA | CANAMICINA | | TOTAL |
|--------------------------------------|-------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 32 | 30 | 62 |
| Sensíveis | 4 | 27 | 31 |
| TOTAL | 36 | 57 | 93 |
| $\chi^2 = 11,47^{***}$ $\phi = 0,35$ | | | |

TABELA 20. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à estreptomicina e valor do teste de χ^2 .

| AMPICILINA | ESTREPTOMICINA | | TOTAL |
|-------------|----------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 27 | 35 | 62 |
| Sensíveis | 11 | 20 | 31 |
| TOTAL | 38 | 55 | 93 |

$\chi^2 = 0,27 \text{ ns}$

TABELA 21. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à ampicilina e à tetraciclina e valor do teste de χ^2 .

| AMPICILINA | TETRACICLINA | | TOTAL |
|-------------|--------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 47 | 15 | 62 |
| Sensíveis | 21 | 10 | 31 |
| TOTAL | 68 | 25 | 93 |

$\chi^2 = 0,34 \text{ ns}$

TABELA 22. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à canamicina, valor do teste de χ^2 e coeficiente \emptyset .

| CLORANFENICOL | CANAMICINA | | TOTAL |
|---------------|-------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 30 | 26 | 56 |
| Sensíveis | 6 | 31 | 37 |
| TOTAL | 36 | 57 | 93 |

$\chi^2 = 11,58^{***}$ $\emptyset = 0,35$

TABELA 23. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à estreptomomicina e valor do teste de χ^2 .

| CLORANFENICOL | ESTREPTOMICINA | | TOTAL |
|---------------|----------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 24 | 32 | 56 |
| Sensíveis | 14 | 23 | 37 |
| TOTAL | 38 | 55 | 93 |

$\chi^2 = 0,07$ ns

TABELA 24. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis ao cloranfenicol e à tetraciclina, valor do teste de χ^2 e coeficiente ϕ .

| CLORANFENICOL | TETRACICLINA | | TOTAL |
|---------------|--------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 49 | 7 | 56 |
| Sensíveis | 19 | 18 | 37 |
| TOTAL | 68 | 25 | 93 |

$\chi^2 = 13,03^{***}$ $\phi = 0,37$

TABELA 25. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à canamicina e à estreptomomicina e valor do teste de χ^2 .

| CANAMICINA | ESTREPTOMICINA | | TOTAL |
|-------------|----------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 16 | 20 | 36 |
| Sensíveis | 22 | 35 | 57 |
| TOTAL | 38 | 55 | 93 |

$\chi^2 = 0,12$ ns

TABELA 26. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à canamicina e à tetraciclina, valor do teste de χ^2 e coeficiente ϕ .

| CANAMICINA | TETRACICLINA | | TOTAL |
|---------------------------------|--------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 32 | 4 | 36 |
| Sensíveis | 36 | 21 | 57 |
| TOTAL | 68 | 25 | 93 |
| $\chi^2 = 6,18^*$ $\phi = 0,26$ | | | |

TABELA 27. Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, resistentes e sensíveis à estreptomicina e à tetraciclina e valor do teste de χ^2 .

| ESTREPTOMICINA | TETRACICLINA | | TOTAL |
|--------------------|--------------|-----------|-------|
| | Resistentes | Sensíveis | |
| Resistentes | 27 | 11 | 38 |
| Sensíveis | 41 | 14 | 55 |
| TOTAL | 68 | 25 | 93 |
| $\chi^2 = 0,37$ ns | | | |

4.6 TRANSFERÊNCIA DE MARCAS DE RESISTÊNCIA

A transferência de marcas de resistência foi pesquisada em 16 amostras de *E. coli* isoladas de urina e fezes, selecionadas por apresentarem simultaneamente, na sua quase totalidade, marcas para a ampicilina, cloranfenicol, canamicina e tetraciclina.

Os modelos de resistência e as marcas de transferência ensaiadas (Ap, Cm, Km e Te) encontram-se sumariados na Tabela 28.

TABELA 28. Modelos de resistência de 16 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes e marcas transferidas para *Escherichia coli* K12.

| AMOSTRAS | MODELO DE RESISTÊNCIA | MARCA(S) TRANSFERIDA(S) |
|----------|-----------------------|-------------------------|
| U01 | Ap Cm Km Te | - ^a |
| U04 | Ap Cm Km Ge Te | Ap Cm Km Te |
| U07 | Ap Cm Te | - |
| U20 | Ap Cm Km Te | - |
| U35 | Ap Cm Km Te | - |
| U42 | Ap Cm Km Ge Te | - |
| U44 | Ap Cm Km Ge Te | Ap Km |
| U48 | Ap Cm Te | - |
| U55 | Ap Cm Km Te | - |
| U61 | Ap Cm Km Te | - |
| F04 | Ap Cm Km Sm Te | Cm Km |
| F08 | Ap Cm Km Te | - |
| F24 | Ap Cm Km Sm Te | - |
| F25 | Ap Cm Km Sm Ge Te | - |
| F27 | Ap Cm Km Sm Te | - |
| F50 | Ap Cm Km Te | Ap Cm Km Te |

^a Sinal indicativo de ausência de transferência para as marcas ensaiadas.

4.7 PRODUÇÃO DE COLICINAS

Das 120 amostras de *E. coli* ensaiadas e listadas na Tabela 2, 22 apresentaram capacidade colicinogênica, a saber: U03, U05, U06, U08, U18, U21, U26, U33, U36, U37, U52, U56, U57, F02, F05, F06, F09, F11, F40, F47, F55 e F56.

A porcentagem e o número dessas amostras colicinogênicas, dispostas segundo o material de origem, constam nas Tabelas 29 e 30.

TABELA 29. Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, colicinogênicas e não colicinogênicas frente a *Escherichia coli* K12.

| COLICINOGENIA | AMOSTRAS | |
|---------------------|----------|-----------------|
| | Número | Porcentagem (%) |
| Colicinogênicas | 22 | 18,33 |
| Não colicinogênicas | 98 | 81,67 |
| TOTAL | 120 | 100,00 |

TABELA 30. Número de amostras de *Escherichia coli* colicinogênicas e não colicinogênicas, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | MATERIAL DE ORIGEM | | TOTAL |
|---------------------|--------------------|-------|-------|
| | Urina | Fezes | |
| Colicinogênicas | 13 | 9 | 22 |
| Não colicinogênicas | 51 | 47 | 98 |
| TOTAL | 64 | 56 | 120 |

$\chi^2 = 0,13 \text{ ns}$

4.8 CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS
E CAPACIDADE COLICINOGÊNICA

A Tabela 31 apresenta as 120 amostras de *E. coli* colici-
nogênicas e não colicinogênicas, classificadas como sensíveis
a oito drogas e resistentes a uma ou mais drogas ensaiadas.

A correlação entre colicinogenia e presença de uma ou
mais marcas de resistência nas 93 amostras de *E. coli* resis-
tentes encontra-se na Tabela 32.

TABELA 31. Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensí-
veis, classificadas segundo a capacidade colicinogênica, e
valor do teste de χ^2 .

| AMOSTRAS | COLICINOGENIA | | TOTAL |
|-------------|-----------------|---------------------|-------|
| | Colicinogênicas | Não colicinogênicas | |
| Resistentes | 16 | 77 | 93 |
| Sensíveis | 6 | 21 | 27 |
| TOTAL | 22 | 98 | 120 |

$\chi^2 = 0,10$ ns

TABELA 32. Número de amostras de *Escherichia coli* mono e polirresisten-
tes, classificadas como colicinogênicas e não colicinogêni-
cas, valor do teste de χ^2 e coeficiente ϕ .

| AMOSTRAS | COLICINOGENIA | | TOTAL |
|------------------|-----------------|---------------------|-------|
| | Colicinogênicas | Não colicinogênicas | |
| Monorresistentes | 9 | 15 | 24 |
| Polirresistentes | 7 | 62 | 69 |
| TOTAL | 16 | 77 | 93 |

$\chi^2 = 7,53^{**}$ $\phi = 0,28$

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1 RESISTÊNCIA A DROGAS

A representação gráfica dos níveis de resistência das 120 amostras de *E. coli* isoladas de urina e fezes (Figuras 1 a 8) revelou curvas bimodais ou aproximadamente bimodais, as quais possibilitaram a classificação das amostras em resistentes e sensíveis frente às drogas ensaiadas. A análise de cada figura revelou que para o ácido nalidíxico (Figura 1) as amostras distribuíram-se preferencialmente em baixas concentrações (< 1 a $2 \mu\text{g/ml}$), sendo estabelecido para a população sensível o nível máximo de resistência de $5 \mu\text{g/ml}$. Assim, 115 amostras foram classificadas como sensíveis, em oposição a cinco amostras resistentes.

Com relação à ampicilina (Figura 2), as amostras distribuíram-se em duas populações bem definidas: uma sensível, constituída por 58 amostras com níveis de resistência inferiores a $50 \mu\text{g/ml}$; e outra resistente, onde 62 amostras apresentaram níveis superiores a $50 \mu\text{g/ml}$.

Para o cloranfenicol (Figura 3), a distribuição das amostras foi mais intensa nas concentrações intermediárias e altas, não havendo um limite distinto entre as amostras consideradas sensíveis e as resistentes. Foi atribuído à população

sensível o nível máximo de resistência de 100 $\mu\text{g/ml}$. Desse modo, 64 amostras foram classificadas como sensíveis, apresentando níveis de resistência compreendidos entre 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$, contrapondo-se a 56 amostras resistentes.

Com relação à amicacina (Figura 4), a grande maioria das amostras apresentou níveis de resistência inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$, tendo sido possível, no entanto, caracterizar duas populações distintas. Como nível máximo de resistência da população sensível foi estabelecida a concentração de 2 $\mu\text{g/ml}$, resultando na classificação de uma única amostra como resistente.

Para a canamicina (Figura 5), uma separação de amostras resistentes e sensíveis mostrou que uma curva bimodal pôde ser definida nas concentrações mais baixas. Assim, 84 amostras foram consideradas sensíveis, apresentando níveis de resistência iguais ou inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que níveis superiores foram encontrados em 36 amostras classificadas como resistentes.

Com referência à estreptomicina (Figura 6), a distribuição das amostras apresentou concentrações preferenciais baixas e intermediárias. À população sensível, constituída por 82 amostras, foi atribuído o nível máximo de resistência de 5 $\mu\text{g/ml}$. Desse modo, foram classificadas como resistentes 38 amostras que apresentaram níveis de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, não sendo observados níveis de resistência superiores a 20 $\mu\text{g/ml}$.

Para a gentamicina (Figura 7), a grande maioria das amostras foi classificada como sensível, apresentando níveis de resistência iguais ou inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$. A população

resistente constituiu-se de oito amostras com níveis variando entre 2 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

Com relação à tetraciclina (Figura 8), foi possível caracterizar a população sensível como constituída por 52 amostras, estabelecendo-se o nível máximo de resistência de 5 $\mu\text{g/ml}$. Portanto 68 amostras foram classificadas como resistentes, apresentando níveis compreendidos entre 10 e 500 $\mu\text{g/ml}$.

A distribuição das amostras frente à ampicilina, canamicina e tetraciclina (Tabela 3 e Figuras 2, 5 e 8) revelou uma ampla variabilidade, uma vez que se encontraram amostras enquadradas em quase todas as concentrações ensaiadas da droga. Outras drogas revelaram menor variabilidade em relação aos níveis de resistência.

Para o cloranfenicol (Figura 3), a distribuição das amostras apresentou-se mais intensa nas concentrações intermediárias e altas, indicando ser elevada a resistência de *E. coli* a essa droga.

Já para o ácido nalidíxico, amicacina e gentamicina, a análise das Figuras 1, 4 e 7 e o confronto destas com a Tabela 7 revelaram que as amostras se apresentaram essencialmente sensíveis ao efeito inibitório dessas drogas, distribuindo-se preferencialmente nas concentrações baixas. Com base nessa observação, pode-se sugerir que essas drogas seriam efetivas contra *E. coli*.

A observação do efeito inibitório do ácido nalidíxico e da gentamicina foi concordante com os resultados apresentados por TRABULSI e cols. (1970), DATTA (1971), SOUZA (1975),

BIAGI (1982), SILVA e cols. (1983) e TEIXEIRA e cols. (1984), os quais demonstraram a eficiência dessas drogas contra *E. coli*, *Shigella* e amostras fitopatogênicas, através da caracterização de populações bacterianas sensíveis.

No presente trabalho, os níveis mínimos e máximos de resistência das populações sensíveis e resistentes frente às drogas ensaiadas (Figuras 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8), excetuando-se o cloranfenicol, de um modo geral aproximaram-se dos descritos por TRABULSI e cols. (1970), com base no mesmo método de classificação. Com referência ao cloranfenicol, esses autores relataram uma distribuição preferencial de 330 amostras de *Shigella* nas concentrações baixas e intermediárias. Essa distribuição diferiu da presentemente estudada, na qual não se observaram amostras de *E. coli* com níveis de resistência inferiores a 10 µg/ml da droga. Tais resultados sugerem que, com o passar do tempo, a seleção de amostras resistentes ao cloranfenicol se estaria processando.

A frequência de amostras resistentes (Tabela 5) comparativamente à relatada por SOUZA (1975), autor que realizou pesquisa semelhante em Belo Horizonte, foi consideravelmente maior. Convém ressaltar que as diferenças observadas podem ter decorrido do ano e da localidade em que foi efetuada a pesquisa, bem como dos diferentes critérios adotados para seleção dos pacientes, tais como: idade e restrição quanto ao uso de medicamentos.

Com relação à frequência de amostras resistentes relatada por outros autores, constatou-se que a mesma diferiu do total obtido por SMITH & ARMOUR (1966), MITSUHASHI e cols.

(1967a, 1967b), BARROS e cols. (1968), ZULIANI & TRABULSI (1968), LEWIS (1968), TRABULSI e cols. (1970), DATTA (1971) e SILVA e cols. (1983). Numa rápida apreciação dos diferentes resultados apresentados por esses autores, notou-se que os mesmos, basicamente, foram concordantes quanto à polirresistência ser mais freqüente do que a monorresistência. Essa constatação foi corroborada pelos resultados apresentados na Tabela 5.

Há de se considerar que a comparação de dados obtidos por diferentes pesquisadores sofre certas limitações, a saber: as drogas empregadas não são sempre as mesmas; o grau da sua utilização varia de localidade para localidade; a determinação dos níveis de resistência das amostras é feita através de diferentes técnicas, meios de cultura e bactérias hospedeiras; e distintos critérios são adotados para classificação das amostras em resistentes e sensíveis.

Conseqüentemente, a título de confronto de resultados, os mesmos teriam que ser previamente corrigidos em função dos critérios adotados e fatores de ordem técnica, para posteriormente ser comparados. Como tal correção não era pertinente à presente pesquisa, considerou-se suficiente concluir que a freqüência obtida de amostras resistentes de *E. coli* foi superior ao esperado, tomando-se como referência o trabalho efetuado por SOUZA (1975). Adicionalmente, essa freqüência provavelmente teria sido maior caso resistência a sulfas tivesse sido ensaiada, podendo-se, assim, detectar amostras exclusivamente sulfa-resistentes, dentre as consideradas sensíveis.

Essa ressalva pode também ser aplicada à constatação de amostras exclusivamente resistentes à ampicilina, à canamicina, à estreptomicina, à tetraciclina e ao ácido nalidíxico (Tabela 4); bem como aos modelos de resistência mais freqüentemente observados: ApCmKmSmTe (11,83%), Te (10,75%) e ApCmSmTe (8,60%). Levando-se em consideração somente as drogas ensaiadas no presente trabalho que foram coincidentes com as empregadas por SOUZA (1975), observou-se que os modelos de resistência mais freqüentes foram semelhantes.

Os resultados expressos na Tabela 8 demonstraram que a proporção de amostras resistentes isoladas de urina foi maior do que a proporção das isoladas de fezes. Entretanto, comparando-se o número de marcas de cada amostra resistente quanto à origem do material (Tabela 9), não se observou diferença entre mono e polirresistência. Analisando-se as marcas isoladamente, constatou-se que a freqüência diferencial de resistência foi devida a um maior número de amostras de urina resistentes à ampicilina, estreptomicina e ao cloranfenicol (Tabelas 11, 15 e 12).

A maior freqüência dessas marcas nas amostras teria resultado da pressão seletiva decorrente do grande emprego de ampicilina na terapêutica de infecções urinárias. As marcas estreptomicina e cloranfenicol estariam sendo selecionadas indiretamente, na suposição de estarem presentes no mesmo plasmídeo.

O maior número de amostras resistentes foi observado com relação à tetraciclina, seguindo-se, em ordem decrescente, a ampicilina e o cloranfenicol (Tabela 6 e Figura 9).

Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por ZULIANI & TRABULSI (1968), TRABULSI e cols. (1970), DATTA (1971) e SOUZA (1975), e sugestivos de que o problema de resistência a essas drogas se estaria agravando devido ao seu uso crescente e indiscriminado.

Numa tentativa de se verificar o grau de associação entre marcas de resistência, drogas para as quais se encontraram 10% ou mais de amostras resistentes foram correlacionadas duas a duas (Tabelas 18 a 27). Os coeficientes ϕ foram estatisticamente significativos e revelaram uma correlação positiva fraca a moderada nos casos de simultaneidade de resistência à ampicilina, canamicina, tetraciclina e ao clo-ranfenicol. Essa associação poderia ser explicada supondo-se que essas marcas estariam próximas no mesmo plasmídeo R. Contudo, procedendo-se à conjugação, foi observada transferência total e parcial das mesmas. Dentre as 16 amostras selecionadas para verificação de resistência plasmidial, apenas quatro delas transferiram marcas para a receptora *E. coli* K12 (Tabela 28). Destas, duas transferiram o modelo completo com relação às marcas ensaiadas.

Dentre os fatores que governam a transferência do plasmídeo R, mencionados por ANDERSON (1968); ou dificultam a sua transferência, segundo WATANABE (1963), TOLEDO e cols. (1970) e HUGHES e cols. (1981), vários se relacionam com a bactéria receptora utilizada na conjugação. Desse modo, caso tivesse sido empregada a linhagem *E. coli* HB101, mais indicada à conjugação comparativamente à *E. coli* K12, o número de amostras a transferir marcas teria sido provavelmente maior.

A segregação dos modelos de resistência, segundo REIS (1974), pode ser explicada como sendo devida a: perda espontânea de marcas; coexistência de dois ou mais plasmídeos R nas células hospedeiras; presença de agregados de plasmídeos; ou dissociação dos plasmídeos R co-integrados. Menciona-se, ainda, a possibilidade da existência de resistência cromossômica e extracromossômica, bem como da presença de dois ou mais plasmídeos R na célula doadora, sendo um deles incapaz de transferir marca para a receptora (ANDERSON, 1968; GUERRY e cols., 1974).

5.2 PRODUÇÃO DE COLICINAS

Dentre as 120 amostras de *E. coli* estudadas, 22 apresentaram-se colicinogênicas frente a *E. coli* K12 (Tabela 29). Esses resultados demonstraram que a frequência de colicinogenia obtida, de um modo geral, foi inferior aos dados apresentados por CHABBERT (1950), REEVES (1965), BRAUDE & SIEMIENSKI (1965, 1968), VOSTI (1968), DAVIS e cols. (1969), SOUZA (1975) e ARAI & KOMATSU (1981). Contudo não se pode descartar a possibilidade de outras amostras portarem o caráter colicinogênico, uma vez que se utilizou somente uma linhagem indicadora para verificação da produção de colicinas.

Com relação às amostras classificadas como colicinogênicas, 13 foram isoladas de urina e nove de fezes, não sendo observada diferença significativa quanto à origem do material. Tal constatação foi sugestiva de que a produção de

colicinas não favorece a implantação de linhagens colicinogênicas em ambiente extra-intestinal, particularmente do trato urinário. Entretanto esses resultados diferem dos obtidos por BRAUDE & SIEMIENSKI (1965, 1968), HARDY (1975) e SOUZA (1975). Este último autor relatou uma frequência maior de colicinogenia em amostras de fezes, atribuindo à colicina um papel seletivo no ambiente intestinal.

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA A DROGAS E COLICINOGENIA

Dentre as 93 amostras classificadas como resistentes frente às drogas ensaiadas, 16 apresentaram-se simultaneamente resistentes e colicinogênicas, conforme dados que constam na Tabela 31.

Correlacionando-se a resistência com a produção de colicinas (Tabela 32), foi constatada uma maior tendência à capacidade colicinogênica nas amostras monorresistentes, particularmente estreptomicina-resistentes.

Resultados semelhantes foram apresentados por LEWIS (1968) e SOUZA (1975), ao estudarem populações de *E. coli*. Esses autores observaram simultaneidade de caracteres relativamente à colicinogenia e monorresistência a drogas. Tanto estes como outros pesquisadores que estudaram as características que conferem vantagem seletiva às populações bacterianas foram concordantes em colocar que o problema é de difícil interpretação.

A título de ilustração, conforme mencionado por SOUZA (1975), marca de resistência devida a genes cromossômicos confere vantagem seletiva a amostras sensíveis quando em ambiente isento de droga. Enquanto que parece não existir tal vantagem quando a resistência é subordinada a plasmídeos R.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADA, N.P.S. & TRABULSI, L.R. Effect of drug resistance in growth and virulence of *Shigella* and invasive *Escherichia coli* strains. *Rev.Microbiol.*, 11:45-9, 1980.
- AMATI, P. Vegetative multiplication of colicinogenic factors after induction in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, 8:239-46, 1964.
- ANDERSON, E.S. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann.Rev.Microbiol.*, 22:131-80, 1968.
- ANDERSON, E.S. & DATTA, N. Resistance to penicillins and its transfer in *Enterobacteriaceae*. *Lancet*, 1:407-9, 1965.
- ARAI, T. & KOMATSU, S. Distribution of the colicinogenic strains and the heat stability of their colicins. *Keio J. Med.*, 30:83-7, 1981.
- BARON, L.S. & FALKOW, S. Genetic transfer of episomes from *Salmonella typhosa* to *Vibrio cholerae*. *Genetics*, 46:849, 1961.
- BARROS, A.C.; PINHEIRO, L.F.L.; AZEVEDO, J.L. Ocorrência de fatores epissômicos que conferem resistência múltipla a drogas (RTF) em linhagens de *Escherichia coli* isoladas no Brasil. *Ciência e Cultura*, 20:164-5, 1968.
- BAZARAL, M. & HELINSKI, D.R. Replication of a bacterial plasmid and an episome in *Escherichia coli*. *Biochem.*, 9: 298-300, 1970.
- BERCHIERI Jr., A.; PAULILLO, A.C.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K.; PESSOA, G.V.A. Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isolados de farinhas de origem animal utilizados no preparo de rações. *Rev.Microbiol.*, 16:56-60, 1985.
- BIAGI, C.M.R. *Práticas de microbiologia e imunologia*. Publicação Faculdade de Ciências Biológicas de Araras, 1980. 113 p.
- BIAGI, C.M.R. *Produção de bacteriocinas por bactérias fitopatogênicas*. Piracicaba, 1982. 140 p. Tese, Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- BIRGE, E.A. *Bacterial and bacteriophage genetics*. New York, Springer-Verlag, 1981. 359 p.
- BOWMAN, C.M.; DAHLBERG, J.E.; IKEMURA, T.; KONISKY, J.; NOMURA, M. Specific inactivation of 16S ribosomal RNA induced by colicin E3 *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 68:964-8, 1971.
- BRADLEY, D.E. Determination of pili by conjugative bacterial drug resistance plasmids of incompatibility groups B, C, H, J, K, M, V, and X. *J.Bacteriol.*, 141:828-37, 1980.
- BRANCHE, W.C.; YOUNG, V.M.; ROBINET, H.G.; MASSEY, E.D. Effect of colicine production on *Escherichia coli* in the normal intestine. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 114:198-201, 1963.
- BRAUDE, A.I. & SIEMIENSKI, J.S. The influence of bacteriocins on resistance to infection by Gram-negative bacteria. I. The effect of colicin on bactericidal power of blood. *J.Clin.Invest.*, 44:849-59, 1965.
- BRAUDE, A.I. & SIEMIENSKI, J.S. The influence of bacteriocins on resistance to infection by Gram-negative bacteria. II. Colicin actions, transfer of colicinogeny, and transfer of antibiotic resistance in urinary infections. *J.Clin.Invest.*, 47:1763-73, 1968.
- BRODA, P. *Plasmids*. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1979. 196 p.
- CAMPBELL, A. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Ann.Rev.Microbiol.*, 35:55-83, 1981.
- CAMPOS, C.E.O.P.; AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. Aspectos genéticos e clínicos da resistência bacteriana a drogas. *ARS CVRANDI*, 9:16-36, 1976.
- CHABBERT, Y. Analyse bactériologique des complexes de colicines produits par 14 souches d'*Escherichia coli* antibiotiques. *Ann.Inst.Pasteur*, 79:51-9, 1950.
- CHANGEUX, J.P. & THIÉRY, J. On the mode of action of colicins: a model of regulation at the membrane level. *J.Theor.Biol.*, 17:315-8, 1967.
- CHAO, L. & LEVIN, B.R. Structural habitats and evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78:6324-8, 1981.
- CHOPRA, I.; SHALES, S.; BALL, P. Tetracycline resistance determinants from groups A to D vary in their ability to confer decreased accumulation of tetracycline derivatives by *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.*, 128:689-92, 1982.
- CLARK, A.J. & WARREN, G.J. Conjugal transmission of plasmids. *Ann.Rev.Genet.*, 13:99-125, 1979.

- CLEWELL, D.B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol.Rev.*, 45:409-36, 1981.
- CLOWES, R.C. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol.Rev.*, 36:361-405, 1972.
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 69:2110-4, 1972.
- COHEN, S.N. & MILLER, C.A. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II. Molecular nature of R-factors isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *J.Mol. Biol.*, 50:671-87, 1970.
- COHEN, S.N.; SILVER, R.P.; SHARP, P.A.; McCOURBREY, A.E. Studies on the molecular nature of R factors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 182:172-87, 1971.
- COSTA, S.O.P. Produção de colicinas em *Escherichia coli* e ação de enzima proteolítica bacteriana sobre colicina. In: AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Nacional, 1973. p.186-8.
- CURTISS III, R. Bacterial conjugation. *Ann.Rev.Microbiol.*, 23:69-136, 1969.
- DAVIES, J. & SMITH, D.I. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann.Rev.Microbiol.*, 32:469-518, 1978.
- DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD Jr., W.B. *Microbiology*. 5.ed. New York, Hoeber Medical, 1969. p.1116-8.
- DATTA, N. Infectious drug resistance. *Brit.Med.Bull.*, 21:254-9, 1965.
- DATTA, N. R factors in *Escherichia coli*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 182:59-64, 1971.
- DATTA, N. & KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, 208:239-41, 1965.
- DE VOS, G.F.; FINAN, T.M.; SIGNER, E.R.; WALKER, G.C. Host-dependent transposon Tn5-mediated streptomycin resistance. *J.Bacteriol.*, 159:395-9, 1984.
- DEMEREK, M. Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J.Bacteriol.*, 56:63-74, 1948.
- DENEER, H.G.; SLANEY, L.; MACLEAN, I.W.; ALBRITTON, W.L. Mobilization of nonconjugative antibiotic resistance plasmids in *Haemophilus ducreyi*. *J.Bacteriol.*, 149:726-82, 1982.

- EASTON, A.M. & ROWND, R.H. The incompatibility product of IncFII R plasmid NR1 controls gene expression in the plasmid replication region. *J.Bacteriol.*, 152:829-39, 1982.
- ECCLES, S.; DOCHERTY, A.; CHOPRA, I.; SHALES, S.; BALL, P. Tetracycline resistance genes from *Bacillus* plasmid pA B124 confer decreased accumulation of the antibiotic in *Bacillus subtilis* but not in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 145:1417-20, 1981.
- ELWELL, L.P. & SHIPLEY, P.L. Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann.Rev. Microbiol.*, 34:465-96, 1980.
- FALKOW, S.; CITARELLA, R.V.; WOHLHIETER, J.A.; WATANABE, T. The molecular nature of R-factors. *J.Mol.Biol.*, 17:102-16, 1966.
- FERBER, D.M.; FOWLER, J.M.; BRUBAKER, R.R. Mutations to tolerance and resistance to pesticin and colicins in *Escherichia coli* Ø. *J.Bacteriol.*, 146:506-11, 1981.
- FERNANDES, M.R.F. & TRABULSI, L.R. Resistência infecciosa a drogas em bactérias. *Rev.Hosp.Clin.Fac.Med. S. Paulo*, 23:153-60, 1968.
- FINCHAM, J.R.S. *Microbial and molecular genetics*. London, The English Universities, 1965. p.130-1.
- FORBES, B.A. & SCHABERG, D.R. Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J.Bacteriol.*, 153:627-34, 1983.
- FOSTER, T.J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol.Rev.*, 47:361-409, 1983.
- FOUTS, K.E. & BARBOUR, S.D. Insertion of transposons through the major cotransduction gap of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 149:106-13, 1982.
- FREDERICQ, P. Colicines et bactériophages. *Ann.Inst. Pasteur*, 84:292-312, 1953.
- FREDERICQ, P. Colicins. *Ann.Rev.Microbiol.*, 11:7-22, 1957.
- FREDERICQ, P. On the nature of colicinogenic factors: a review. *J.Theor.Biol.*, 4:159-65, 1963.
- FREDERICQ, P. & BETZ-BAREAU, M. Recombinants génétique de souches marquées par résistance aux colicines et aux bactériophages. *Ann.Inst.Pasteur*, 83:283-94, 1952.

- FRICK, K.K.; QUACKENBUSH, R.L.; KONISKY, J. Cloning of immunity and structural genes for colicin V. *J.Bacteriol.*, 148:498-507, 1981.
- GARCIA, M.E.; NAGEL DE ZWAIG, R.; PUIG, J. Mode of action of colicin S8. *J.Gen.Microbiol.*, 128:973-9, 1982.
- GERDES, K.; LARSEN, J.E.L.; MOLIN, S. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J.Bacteriol.*, 161:292-8, 1985.
- GINOSA, H.S. & MATNEY, T.S. Transmission of a resistance transfer factor from *Escherichia coli* to two species of *Pasteurella*. *J.Bacteriol.*, 85:1177-8, 1963.
- GLAZEBROOK, J.A.; FORSTER, J.W.; STRIKE, P. Regulation of expression of the colicin gene of Il gorup plasmid TP110. *J.Bacteriol.*, 155:122-8, 1983.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 3.ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1966. 404 p.
- GUERRY, P.; EMBDEN, J.; FALKOW, S. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J. Bacteriol.*, 117:619-30, 1974.
- GUSTAFSSON, P. & NORDSTRÖM, K. Control of plasmid R1 replication in shifts between different copy number levels. *J. Bacteriol.*, 141:106-10, 1980.
- HAMON, Y. & LEWE, Z.V. Etude de l'induction par l'irradiation ultraviolette de quelques cultures d'*Escherichia coli* K12 préalablement rendues colicinogènes par transduction. *Ann. Inst.Pasteur*, 89:336-45, 1955.
- HAMON, Y. & PÉRON, Y. Description de sept nouveaux types de colicines. Etat actuel de la classification de ces antibiotiques. *Ann.Inst.Pasteur*, 107:44-54, 1964.
- HARADA, K.; SUZUKI, M.; KAMEDA, M.; MITSUHASHI, S. On the drug-resistance of enteric bacteria. 2.Transmission of the drug-resistance among *Enterobacteriaceae*. *Japan.J.Exp.Med.*, 30:289-99, 1960.
- HARDY, K. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, 39:464-515, 1975.
- HARDY, K. Bacterial plasmids. In: COLA, J.A. & KNOWLES, C.J. *Aspects of microbiology*. Hong Kong, Thomas Nelson and Sons, 1981. v.4.
- HAUDUROY, P. & PAPAVALASSILIOU, J. De l'hétérogénéité des souches d'*Escherichia coli* productrices de colicine. *Ann.Inst. Pasteur*, 102:644-9, 1962.

- HELINSKI, D.R. Plasmid determined resistance of antibiotics: molecular properties of R factors. *Ann.Rev.Microbiol.*, 27: 437-70, 1973.
- HIROTA, Y.; NISHIMURA, Y.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Effect of drug-resistance factor R on the F properties of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 87:341-51, 1964.
- HUGHES, C.; BAUER, E.; ROBERTS, A.P. Spread of R-plasmids among *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 20:496-502, 1981.
- HUGHES, C.; PHILLIPS, R.; ROBERTS, A.P. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin and antibiotic resistance determinants. *Infect. Immun.*, 35:270-5, 1982.
- JACOB, A. & HOBBS, S.J. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J.Bacteriol.*, 117:360-72, 1974.
- JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann.Inst. Pasteur*, 84:222-4, 1953.
- JACOB, F.; SIMINOVITCH, L.; WOLLMAN, E. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. *Ann.Inst.Pasteur*, 83:294-315, 1952.
- JAKES, K.S. & ZINDER, N.D. Plasmid Col E3 specifies a lysis protein. *J.Bacteriol.*, 157:582-90, 1984.
- IMANAKA, T.; FUJII, M.; AIBA, S. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J.Bacteriol.*, 146:1091-7, 1981.
- IVANOVICS, G. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. *Bacteriol.Rev.*, 26:108-18, 1962.
- KABINS, S.A. & COHEN, S. Resistance-transfer factor in *Enterobacteriaceae*. *New Engl.J.Med.*, 275:248-52, 1966.
- KAYALAR, C. & LURIA, S.E. Channel formation by colicin K on liposomes. *Bacteriol.Proc.*, 6:297-306, 1979.
- KELSTRUP, J. & GIBBONS, R.J. Inactivation of bacteriocins in the intestinal canal and oral cavity. *J.Bacteriol.*, 99: 888-90, 1969.
- KLECKNER, N. Transposable elements in prokaryotes. *Ann.Rev. Genet.*, 15:341-404, 1981.

- KLOCK, G.; UNGER, B.; GATZ, C.; HILLEN, W.; ALTENBUCHNER, J.; SCHMID, K.; SCHMITT, R. Heterologous repressor-operator recognition among four classes of tetracycline resistance determinants. *J.Bacteriol.*, 161:326-32, 1985.
- KOCK, A.L. Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiol.Rev.*, 45:355-78, 1981.
- KONISKY, J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann.Rev.Microbiol.*, 36:125-44, 1982.
- LACAZ, C.S. *Antibióticos*. 2.ed. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1969. 609 p.
- LAWN, A.M.; MEYNELL, E.; MEYNELL, G.G.; DATTA, N. Sex pilli and classification of sex factors in the *Enterobacteriaceae*. *Nature*, 216:343-6, 1967.
- LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J.Bacteriol.*, 63:339-406, 1952.
- LEVIN, J. *Estatística aplicada a ciências humanas*. São Paulo, Harbra, 1978. 310 p.
- LEWIS, M.J. Transferable drug resistance and other transferable agents in strains of *Escherichia coli* from two human populations. *Lancet*, 1:1389-93, 1968.
- LURIA, S.E. On the mechanisms of action of colicins. *Ann. Inst.Pasteur*, 107:67-73, 1964.
- LURIA, S.E. & DELBRUCK, M. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28:491-511, 1943.
- MAEDA, A. & NOMURA, M. Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins. *J.Bacteriol.*, 91:685-94, 1966.
- MAGALHÃES, M. & VÉRAS, A. Plasmídios R de cepas hospitalares de *Salmonella typhimurium*. *Rev.Microbiol.*, 10:43-5, 1979.
- MALES, B.M. & STOCKER, B.A. Colicins E4, E5, E6 and A and properties of *btuB*⁺ colicinogenic transconjugants. *J.Gen. Microbiol.*, 128:95-106, 1982.
- MAYR-HARTING, A. The adsorption of colicine. *J.Path.Bact.*, 87:255-66, 1964.
- MCCOMBIE, W.R.; HANSEN, J.B.; ZYLSTRA, G.J.; MAURER, B.; OLSEN, R.H. *Pseudomonas* streptomycin resistance transposon associated with R-plasmid mobilization. *J.Bacteriol.*, 155:40-8, 1983.

- MEYER, J.F.; NIES, B.A.; WIEDEMANN, B. Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *J.Bacteriol.*, 155:755-60, 1983.
- MEYNELL, E. & DATTA, N. Functional homology of the sex-factor and resistance transfer factors. *Nature*, 207:884-5, 1965.
- MEYNELL, E.; MEYNELL, G.G.; DATTA, N. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bacteriol.Rev.*, 32:55-83, 1968.
- MIKI, T.; EASTON, A.M.; ROWND, R.H. Cloning of replication, incompatibility, and stability functions of R plasmid NR1. *J.Bacteriol.*, 141:87-99, 1980.
- MILLIKEN, C.E. & CLOWES, R.C. Molecular structure of an R-factor, its component drug-resistance determinants and transfer factor. *J.Bacteriol.*, 113:1026-33, 1973.
- MINGOIA, Q. *Química farmacêutica*. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1967. 788 p.
- MITSUHASHI, S. Transmissible drug-resistance factor R. *Gunma J.Med.Sci.*, 14:169-209, 1965.
- MITSUHASHI, S. The R factors. *J.Infect.Dis.*, 119:89-100, 1969.
- MITSUHASHI, S.; HARADA, K.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R. Drug-resistance of enteric bacteria. 5. Drug-resistance of *Escherichia coli* isolated from human being. *Japan.J.Exp.Med.*, 31:53-60, 1961.
- MITSUHASHI, S.; HARADA, K.; HASHIMOTO, H.; KAMEDA, M.; SUZUKI, M. Combination of two types of transmissible drug-resistance factors in a host bacterium. *J.Bacteriol.*, 84:9-16, 1962.
- MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T.; NAGAI, Y. Drug resistance of enteric bacteria. IX. Distribution of R factors in Gram-negative bacteria from clinical sources. *J.Bacteriol.*, 93:1242-5, 1967a.
- MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; SUZUKI, K. Drug resistance of enteric bacteria. XIII. Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock. *J.Bacteriol.*, 94:1166-9, 1967b.
- MOLIN, S. & NORDSTRÖM, K. Control of plasmid R1 replication: functions involved in replication copy number control, incompatibility, and switch-off of replication. *J.Bacteriol.*, 141:111-20, 1980.
- MORENO, G. Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:47-55, 1972.

- NAGEL DE ZWAIG, R. Mode of action of colicin A. *J.Bacteriol.*, 99:913-4, 1969.
- NEVE, H.; GEIS, A.; TEUBER, M. Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J.Bacteriol.*, 157:833-8, 1984.
- NEWCOMBE, H.B. Origin of bacterial variants. *Nature*, 164: 150-1, 1949.
- NISIOKA, T.; MITANI, M.; CLOWES, R. Composite circular forms of Rfactor deoxyribonucleic acid molecules. *J.Bacteriol.*, 97:376-85, 1969.
- NOMURA, M. Mode of action of colicines. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 28:315-24, 1963.
- NOMURA, M. Mechanism of action of colicines. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA*, 52:1514-21, 1964.
- NOMURA, M. Colicins and related bacteriocins. *Ann.Rev. Microbiol.*, 21:257-84, 1967.
- NOVICK, R.P. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol.Rev.*, 33:210-63, 1969.
- OHNISHI, Y. & AKIMOTO, S. I-like R plasmids promote degradation of stable ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 144:833-5, 1980.
- O'NEIL, E.A.; KIELY, G.M.; BENDER, R.A. Transposon Tn5 encodes streptomycin resistance in nonenteric bacteria. *J. Bacteriol.*, 159:388-9, 1984.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. Plasmid-determined H₂S character in *Escherichia coli* and its relation to plasmid-carried raffinose fermentation and tetracycline resistance characters. Examination of 32 H₂S-positive strains isolated during the years 1950 to 1971. *J.Gen.Microbiol.*, 77:487-99, 1973.
- OU, J.T. & ANDERSON, T.F. Role of pilli in bacterial conjugation. *J.Bacteriol.*, 102:648-54, 1970.
- OZEKI, H.; STOCKER, B.A.D.; MARGERIE, H. Production of colicine by single bacteria. *Nature*, 184:337-9, 1959.
- PETERSON, B.C. & ROWND, R.H. Homologous sequences other than insertion elements can serve as recombination sites in plasmid drug resistance genes amplification. *J.Bacteriol.*, 156:177-85, 1983.
- PINHEIRO, L.F.L.; BARROS, A.C.; AZEVEDO, J.L. Resistance to drugs and infectious drug resistance in *Escherichia coli*. *O Hospital*, 76:271-8, 1969.

- PLATE, C.A. & LURIA, S.E. Stages in colicin K action, as revealed by the action of trypsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 69:2030-4, 1972.
- PUGSLEY, A.P. Genetic analysis of Col N plasmid determinants for colicin production, release and immunity. *J.Bacteriol.*, 158:523-9, 1984.
- PUGSLEY, A.P. & SCHWARTZ, M. Expression of a gene in a 400-base-pair fragment of colicin plasmid Col E2-P9 is sufficient to cause host cell lysis. *J.Bacteriol.*, 156:109-14, 1983.
- RASHTCHIAN, A. & BOOTH, S.J. Stability in *Escherichia coli* of an antibiotic resistance plasmid from *Bacteroides fragilis*. *J.Bacteriol.*, 146:121-7, 1981.
- REEVES, P. The bacteriocins. *Bacteriol.Rev.*, 29:24-45, 1965.
- REIS, M.H.L. *Distribuição e natureza genética da resistência ao mercúrio em enterobactérias*. São Paulo, 1974. Tese, Mestrado, Escola Paulista de Medicina.
- RICHARDSON, H.; SEWARD, B.; GREEN, C.A. The survival of colicine-sensitive bacteria when grown with colicine-producing bacteria. *J.Med.Microbiol.*, 4:63-72, 1971.
- ROMERO, E. & MEYNELL, E. Covert fi^- R factors $fi^+ R^+$ strains of bacteria. *J.Bacteriol.*, 97:780-6, 1969.
- ROTH, T.F. & HELINSKI, D.R. Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 58:650-7, 1967.
- ROWND, R.; KASAMATSU, H.; MICKEL, S. The molecular nature and replication of drug resistance factors of the *Enterobacteriaceae*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 182:188-206, 1971.
- ROWND, R.; NAKAYA, R.; NAKAMURA, A. Molecular nature of the drug-resistance factors of the *Enterobacteriaceae*. *J.Mol.Biol.*, 17:376-93, 1966.
- SABET, S.F. & SCHNAITMAN, C.A. Localization and solubilization of colicin receptors. *J.Bacteriol.*, 108:422-30, 1971.
- SANT'ANA, Y.X. & SOUZA, E.C. Plasmids that simultaneously carry markers for colicinogeny and resistance to tetracycline in *Salmonella typhimurium*. *Rev.Bras.Genet.*, 8:231-9, 1985.
- SCHUKIN, N.N. Plasmid Col VB trp maintenance in *Erwinia carotovora*. *J.Bacteriol.*, 147:1015-20, 1981.

- SEARS, H.J. & BROWNLEE, I. Further observations on the persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. *J.Bacteriol.*, 63:47-57, 1952.
- SEARS, H.J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J.K. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. *J.Bacteriol.*, 59:293-301, 1950.
- SETLOW, J.K.; MCCARTHY, D.; CLAYTON, N. Novobiocin resistance marker in *Haemophilus influenzae* that is not expressed on a plasmid. *J.Bacteriol.*, 151:1358-62, 1982.
- SICCARDI, A.G. Colicin resistance associated with resistance factors in *Escherichia coli*. *Genet.Res.*, 8:219-28, 1966.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw-Hill, 1975. 350 p.
- SILVA, M.L.M.; YAMAMOTO, M.A.; SEVERO, N.P.F. Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas. *Rev. Microbiol.*, 14:254-8, 1983.
- SILVER, R.P. & FALKOW, S. Specific labeling and physical characterization of R-factor deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 104:331-9, 1970.
- ŠMARDÁ, J. Novel approaches to the model of action of colicins. *Folia microbiologica*, 20:264-71, 1975.
- ŠMARDÁ, J. & SCHUHMANN, E. Do certain colicines and phages share common receptors? *Nature*, 213:614, 1967.
- ŠMARDÁ, J. & TAUBENECK, U. Situation of colicin receptors in surface layers of bacterial cells. *J.Gen.Microbiol.*, 52:161-72, 1968.
- SMITH, D.H. & ARMOUR, S.E. Transferable R factors in enteric bacteria causing infection of the genitourinary tract. *Lancet*, 2:15-8, 1966.
- SOARES, L.A. & TRABULSI, L.R. Atividade antibacteriana *in vitro* de gentamicina, tobramicina e sisomicina. *Rev. Microbiol.*, 10:1-5, 1979.
- SOUZA, E.C. *Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em Escherichia coli*. Belo Horizonte, 1975. 79 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- STUY, J.H. Chromosomally integrated conjugative plasmids are common in antibiotic-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.*, 142:925-30, 1980.

- SUGINO, Y. & HIROTA, Y. Conjugal fertility associated with resistance factor R in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 84: 902-10, 1962.
- TANAKA, M.; YAMAMOTO, T.; SAWAI, T. Evolution of complex resistance transposons from an ancestral mercury transposon. *J.Bacteriol.*, 153:1432-8, 1983.
- TEIXEIRA, L.M.; SUASSUNA, I.R.; SUASSUNA, I. Resistência a antimicrobianos em amostras de *Shigella* isoladas no Rio de Janeiro. *Rev.Microbiol.*, 15:231-8, 1984.
- THOMSON, J.A.; HENDSON, M.; MAGNES, R.M. Mutagenesis by insertion of drug resistance transposon Tn7 into a *Vibrio* species. *J.Bacteriol.*, 148:374-8, 1981.
- TOKUDA, H. & KONISKY, J. Effect of colicins Ia and EI on ion permeability of liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6167-71, 1979.
- TOLEDO, M.R.F.; ZULIANI, M.E.; TRABULSI, L.R. Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated *Shigella* strains. *Rev.Microbiol.*, 1:1-11, 1970.
- TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. Estudos sobre a *Escherichia coli* O111:B4. III. Sensibilidade *in vitro* à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, 11:323-34, 1969.
- TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E.; TOLEDO, M.R.F. Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo, 1963 and 1968. *Rev.Microbiol.*, 1:71-7, 1971.
- VAPNEK, D.; LIPMAN, M.B.; RUPP, W.D. Physical mechanism of transfer R factors in *Escherichia coli*. *Bacteriol.*, 108:508-14, 1971.
- VOSTI, K.L. Production of and sensitivity to colicins among serologically classified strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 96:1947-52, 1968.
- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol.Rev.*, 27:87-115, 1963.
- WATANABE, T. & FUKASAWA, T. "Resistance transfer factor" an episome in *Enterobacteriaceae*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 3:660-5, 1960.
- WATANABE, T. & FUKASAWA, T. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J.Bacteriol.*, 81:669-78, 1961a.
- WATANABE, T. & FUKASAWA, T. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J.Bacteriol.*, 81:679-83, 1961b.

- WATANABE, T.; NISHIDA, H.; OGATA, C.; ARAI, T.; SATO, S. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. VII. Two types of naturally occurring R factors. *J.Bacteriol.*, 88:716-26, 1964a.
- WATANABE, T.; OGATA, C.; SATO, S. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. VIII. Six-drug-resistance R factor. *J.Bacteriol.*, 88:922-8, 1964b.
- WATSON, D.H. & SHERATT, D.J. *In vivo* proteolytic cleavage of colicins requires specific receptor binding. *Nature*, 278: 362-4, 1979.
- WEAVER, C.A.; REDBORG, A.H.; KONISKY, J. Plasmid-determined immunity of *Escherichia coli* K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein. *J.Bacteriol.*, 148: 817-28, 1981.
- WELCH, R.A. & MACRINA, F.L. Physical characterization of *Bacteroides fragilis* R plasmid pBF4. *J.Bacteriol.*, 145: 867-72, 1981.
- WENDT, L. Mechanism of colicin action: early events. *J. Bacteriol.*, 104:1236-41, 1970.
- WIEBAUER, K.; SCHRAML, S.; SHALES, S.W.; SCHMITT, R. Tetracycline resistance transposon Tn1721: *recA*-dependent gene amplification and expression of tetracycline resistance. *J.Bacteriol.*, 147:851-9, 1981.
- WILLETTS, N. & SKURRAY, R. The conjugation system of F-like plasmids. *Ann.Rev.Genet.*, 14:41-76, 1980.
- ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L.R. Sensibilidade *in vitro* à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, 10:70-7, 1968.